

Medizinische Fakultät
der
Universität Essen

Aus dem Institut für Anatomie

Einfluß verschiedener Connexin-Kanäle auf das
Proliferations-, Invasions- und Differenzierungsverhalten der
Chorionkarzinomzelllinie BeWo nach stabiler Transfektion

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Essen

Vorgelegt von
Martin Gerke
aus Kevelaer
2001

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. H. Grosse-Wilde

1. Gutachter: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. E. Winterhager

2. Gutachter: Privatdozent Dr. rer. nat. J. Thomale

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2001

Vorveröffentlichungen:

Winterhager, E., von Ostau, C., Gerke, M., Grümmner, R., Traub, O., Kaufmann, P. (1999): Connexin Expression Patterns in Human Trophoblast Cells during Placental Development. Placenta, 20, 627-638.

Gerke, M., Hellmann, P., Grümmner, R., Winterhager, E. (2000): Connexin genes alter the cell physiology of choriocarcinoma cells. Poster auf der 17. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 29.09. bis 1.10.2000.

Meinen Eltern

**Einfluß verschiedener Connexin-Kanäle auf das Proliferations-, Invasions-
und Differenzierungsverhalten der Chorionkarzinomzelllinie BeWo
nach stabiler Transfektion**

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
1. Gap-junction-Kanäle und zelluläre Kommunikation	1
1.1 Aufbau, Struktur und Verteilung der Gap-junctions	1
1.2 Funktion, Regulation und pathogenetische Bedeutung der Gap-junctions	5
2. Die Plazenta und die Rolle von Gap-junctions bei der Trophoblastentwicklung	7
3. Das Chorionkarzinom	10
4. Gap-junction und Tumorgenese	13
5. Zielsetzung	14
B. Material und Methoden	15
1. Molekularbiologisches Arbeiten	15
1.1 Vektoren	15
1.2 DNA	16
1.2.1 Vermehrung und Isolierung der Expressionsplasmide und Basisvektoren	16
1.2.1.1 Transformation von E. coli	16
1.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA.	17
1.2.3 Spaltung der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen (Spaltansatz für Elektrophorese)	18
1.2.4 Elektrophorese	18
1.2.5 Maxipräparation von Plasmid-DNA	19
1.2.6 Isolierung von cDNA aus Agarosegelen	19
1.3 RNA	20
1.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA	20
1.3.2 Fällung von RNA	21
1.3.3 Auftrennung von RNA durch Gelelektrophorese	21

1.3.4 „Northern Blot“-Analyse von RNA	22
1.3.4.1 Kapillarblot	22
1.3.4.2 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden	22
1.3.4.3 Hybridisierung	22
2. Zellen und Zellkultur	23
2.1 Zelllinie	23
2.2 Kultivierung von Zellen	23
2.2.1 Allgemeines und Kulturmedium	23
2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
2.4 Stabile Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	25
3. Immunhistochemie	26
4. Proliferationsrate	28
5. β -hCG-Bestimmung	30
6. Nacktmäuse	30
7. Anhang	31
7.1 Karten der Vektoren	31
7.2 Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Kulturmedien	33
7.3 Liste der Chemikalien	33
7.3.1 Molekularbiologie	33
7.3.2 Zellkultur	34
C. Ergebnisse	35
1. Selektion von Transfektanten und immunhistochemische Untersuchungen	35
1.1 Stabile Transfektion von BeWo-Zellen mit Cx26	37
1.2 Stabile Transfektion von BeWo-Zellen mit Cx40	38
1.3 Stabile Transfektion von BeWo-Zellen mit Cx43	38
2. Proliferationsverhalten von verschiedenen BeWo-Connexin-Transfektanten im Vergleich zu den Puromycin-Klonen mit transfiziertem Leervektor und den parentalen BeWo-Zellen	40
2.1 Erster Versuchsansatz zur Ermittlung der Proliferationsrate	40
2.1.1 Proliferationskurven der Cx26-Transfektanten	40
2.1.2 Proliferationskurven der Cx43-Transfektanten	41

2.1.3 Proliferationskurven der Cx40-Transfektanten	43
2.2 Wiederholter Versuchsansatz zur Ermittlung der Proliferationsrate	44
2.2.1 Proliferationskurven der Cx26-Transfektanten	44
2.2.2 Proliferationskurven der Cx43-Transfektanten	45
2.2.3 Proliferationskurven der Cx40-Transfektanten	46
2.3 Immunhistochemie und RNA-Analyse der Cx26-Transfektanten	47
2.4 Immunhistochemie und RNA-Analyse der Cx43-Transfektanten	48
2.5 Immunhistochemie und RNA-Analyse der Cx40-Transfektanten	50
3. β -hCG-Hormonproduktion von verschiedenen BeWo-Connexin-Transfektanten im Vergleich zu ihren Puromycin-Klonen und den parentalen BeWo-Zellen	52
3.1 β -hCG-Hormonproduktion exemplarischer Cx-Transfektanten der ersten Versuchsreihe	53
3.2 β -hCG-Hormonproduktion der Cx-Transfektanten im Wiederholungsansatz	54
4. Einfluß des Puromycin-Selektionsdruckes auf Proliferation und β -hCG-Hormonproduktion	56
4.1 Proliferationsverhalten und β -hCG-Hormonproduktion bei verschiedenen Puromycinkonzentrationen am Beispiel zweier Cx43-Transfektanten	56
4.2 Proliferationsverhalten und β -hCG-Hormonproduktion bei verschiedenen Puromycinkonzentrationen am Beispiel des Puromycin-Klons mit dem pSG5-(1)-Leervektor	58
5. RNA-Analyse des Puromycin-Resistenzgens	60
6. Tumorwachstum im Nacktmausmodell	62
D. Diskussion	63
1. Connexine regulieren Wachstums- und Differenzierungsvorgänge in verschiedenen Geweben	63
2. Variationen im Connexin-Expressionmuster während der Plazentation und die Art des Connexin-Typs regulieren die Stärke der Proliferation und Differenzierung	64
3. Eine Cx40-Expression geht mit einer verstärkten Proliferation einher und wird in unterschiedlichem Ausmaß bei Chorionkarzinomzellen gefunden	65
4. Die exogene Cx-Expression ändert das Proliferationsverhalten der Chorionkarzinomzelle BeWo	67

5.	Einfluß der endogenen Cx40-Expression auf das Proliferationsverhalten nach exogenem Cx-Verlust	70
6.	Einfluß des Selektionsdruckes von Puromycin auf die Proliferation und Differenzierung	71
7.	Eine lange Kulturdauer begünstigt durch Selektion Klone, die ohne Expression des Resistenzgens den Selektionsdruck von Puromycin tolerieren	72
8.	Die β -hCG-Hormonproduktion kann als Marker der Toxizität für die Zellklone herangezogen werden und Cx-Kanäle helfen bei der Detoxifizierung	74
9.	Schlußfolgerungen und Ausblick für Transfektionsexperimente	76
E.	Zusammenfassung	80
F.	Literatur	84

Abkürzungen und Bezeichnungen**Physikalische Maßeinheiten:**

bp:	Basenpaare	s, min, h, d;	Sekunde, Minute, Stunde, Tag
kb:	Kilobasenpaare	µl, ml, l	Mikroliter, Mililiter, Liter
Da:	Dalton	χ:	Lamda
Kda:	Kilodalton	Å:	Ångström
Vol:	Volumen	v/v:	Volumen pro Volumen
M:	Molar	w/v:	Gewicht pro Volumen
mM:	Milimolar	V:	Volt
°C:	Grad Celsius	Upm:	Umdrehungen pro Minute
U:	Unit		

Biomoleküle:

DNA:	Desoxyribonukleinsäure
cDNA:	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
RNA:	Ribonukleinsäure
mRNA:	Boten-Ribonukleinsäure
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
dNTP:	Nukleosidtriphosphat
dCTP:	Desoxycytidintriphosphat
IgG:	Immunglobulin G

Sonstige Abkürzungen:

Cx:	Connexin	H ₂ O bid.:	H ₂ O bidest
Puro-Klon:	Puromycin-Klon	et al.:	et alii = und andere
β-hCG:	β-humanes Choriongonadotropin	UV:	Ultraviolett
LY:	Lucifer Yellow	FITC:	Fluorescein-Isothiocyanat
E. coli:	Escherichia coli	FCS:	fötales Kälberserum
ü.N.:	über Nacht	Pen/Strep:	Penicillin/Streptomycin
RT:	Raumtemperatur	BSA:	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion		
PBS:	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)		

A. Einleitung

1. Gap-junction-Kanäle und zelluläre Kommunikation

Damit Organe ihre Funktionen koordiniert ausüben können, ist die interzelluläre Kommunikation von Zellverbänden von entscheidender Bedeutung. Dies gewährleistet eine zielgerichtete Abstimmung zellulärer Interaktionen in einem multizellulären Organismus und kennzeichnet letztendlich den Unterschied eines funktionsfähigen Organs zu einer bloßen Ansammlung von Einzelzellen.

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase und Anpassung des Körpers auf sich ständig ändernde Umweltbedingungen besitzt der Organismus verschiedene Wege, Kommunikation unter den einzelnen Organen, Geweben und Zellen zu erreichen. Einerseits erfolgt diese über größere Distanzen durch neuronale und endokrine Mechanismen (Neurotransmitter, Hormone, Mediatoren), andererseits wird Kommunikation über kurze Entfernungen durch parakrine Signale, Wachstumsfaktoren sowie durch direkte Kommunikation der Zellen untereinander über interzelluläre Kanäle, den Gap-junctions, realisiert.

Gap-junction-Kanäle sind membrangebundene Proteinstrukturen, die zwei benachbarte Zellen verbinden und über die ein direkter Austausch von chemischen oder elektrischen Signalen möglich ist. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle von Proliferation und Zelldifferenzierung (Guthrie und Gilua, 1989). Veränderungen in der Verteilung, Expression und Funktion von Gap-junctions werden in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen sowie in der Tumorgenese diskutiert (Yamasaki et al., 1999).

Die Bedeutung der direkten Zell-Zell-Kommunikation mittels Gap-junctions für die Kontrolle von Wachstum, Invasivität und Differenzierung einer Tumorzelllinie ist Gegenstand dieser Arbeit. Durch Transfektionsexperimente an einer Chorionkarzinomzelllinie, welche sich durch unkontrolliertes Wachstum und hohe Invasivität auszeichnet, sollen stabile Klone etabliert werden, die über Gap-junction-Kanäle gekoppelt sind und für *in vitro*- und *in vivo*-Experimente zur Verfügung stehen, in denen ihr Einfluß auf Wachstum, Invasion und Differenzierung analysiert wird.

1.1 Aufbau, Struktur und Verteilung der Gap-junctions

Durch die Elektronenmikroskopie an Dünnschnitten und von Gefrierbrüchen sind diverse interzelluläre Membrankontakte entdeckt und beschrieben worden. Mit Hilfe dieser Techniken wurden auch die Zell-Zell-Kommunikationskanäle detektiert, welche als Gap-junctions bezeichnet wurden.

Gap-junctions findet man bei praktisch allen Säugetieren und in vielen Geweben in großer Zahl. Abgesehen von Blutzellen und Skelettmuskelzellen kommunizieren alle bislang untersuchten Körperzellen über diese Zell-Zell-Kanäle (Kumar und Gilula, 1996). Elektronenmikroskopischen Aufnahmen entnimmt man, daß die Zellmembranen zweier benachbarter Zel-

len in einer solchen Kontaktzone sich nicht direkt berühren, sondern durch eine ungefähr 2 nm breite Lücke getrennt sind.

Gap-junction-Kanäle bestehen aus Transmembranproteinen, die aus zwei aneinander gegenüberliegenden Halbkanälen, den sog. Connexonen, gebildet werden. Die Connexone in den Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen bilden einen durchgehenden, wäßrigen Kanal, der die beiden Zellinnenräume verbindet (Abb. 1). Diese Verbindung kommt dabei so zustande, daß die zugehörigen Plasmamembranen nicht dicht beieinanderliegen, sondern durch eine Lücke (gap) getrennt sind - daher der Name "Gap-junction". Diese Hemikanäle, die von beiden kommunizierenden Zellen gebildet werden, bestehen als Hexamer aus sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen (Makowski et al., 1977).

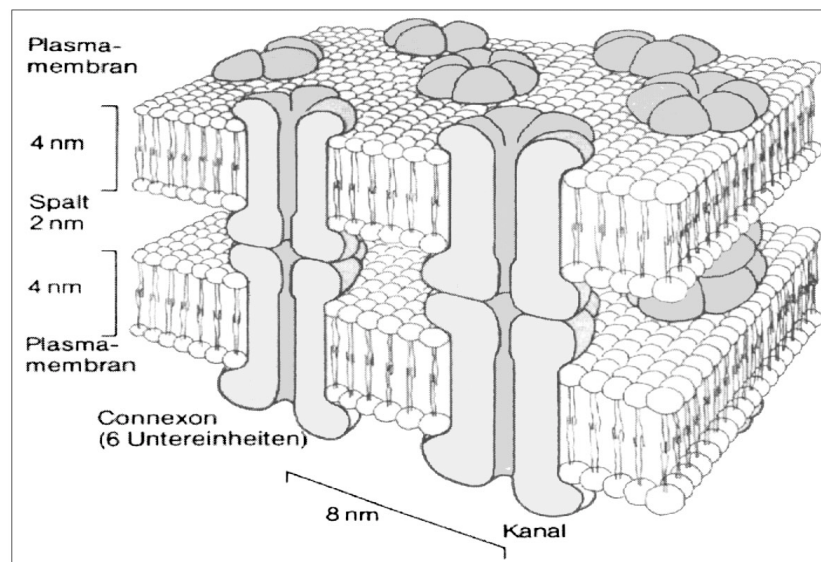


Abb. 1: Modell von Gap-junction Proteinen in interagierenden Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen (aus Schmidt und Thews, 25. Auflage, 1993).

Zwei dieser senkrecht zur Membranebene stehenden Hexamere bilden den dodecameren Kanal mit einem inneren Porendurchmesser von 12-13 Å (1,2-2 nm) und einer Länge von etwa 150 Å (Perkins et al., 1997). Diese zentrale, flüssigkeitsgefüllte Pore ermöglicht einen passiven Transport von Ionen, wie z.B. Calcium, sowie von hydrophilen Molekülen mit einem Molekulargewicht bis ca. 1000 Dalton, wie z.B. die second messenger cAMP und Inositol-Triphosphat. Außerdem wird der Transfer von Metaboliten wie Aminosäuren, Nukleotiden, Glukose und dessen Derivate vom Zytoplasma einer Zelle in das Zytoplasma einer benachbarten Zelle über diese Kanäle gesteuert (Loewenstein, 1979 und Schwartzmann et al., 1981). Auf diese Weise regulieren und koordinieren sich gekoppelte Zellen im Stoffwechsel, was besonders bei der Wachstumskontrolle eine Rolle zu spielen scheint (Loewenstein, 1979).

Jedes der Connexine ist eine Polypeptidkette mit vier α -helikalen transmembranösen Domänen. Die beiden Enden dieses Proteins (N-Terminus und C-Terminus) liegen intrazellulär, so

daß zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife gebildet werden. Die Aminosäuresequenz der Connexinproteine ist hoch konserviert. Für die meisten von ihnen findet man eine gute Übereinstimmung im Aufbau der membrandurchquerenden Helices, der beiden äußeren Schleifen und des kurzen NH_2 -Endes, während die innere Schleife und das lange COOH -Ende variieren. Einige Sequenzen von Aminosäuren, insbesondere im COOH -Ende, wirken als Modulation für die Steuerung der Leitfähigkeit des Kanals. Die dritte membranüberquerende Helix eines Connexins enthält einige hydrophile Aminosäuren, während in den drei anderen Helices vorwiegend hydrophobe Aminosäuren vorkommen. Daraus kann man schließen, daß die dritte Helix so in der Membran liegt, daß ihre hydrophilen Aminosäuren Teil der inneren Kanalwand werden (Abb. 2).

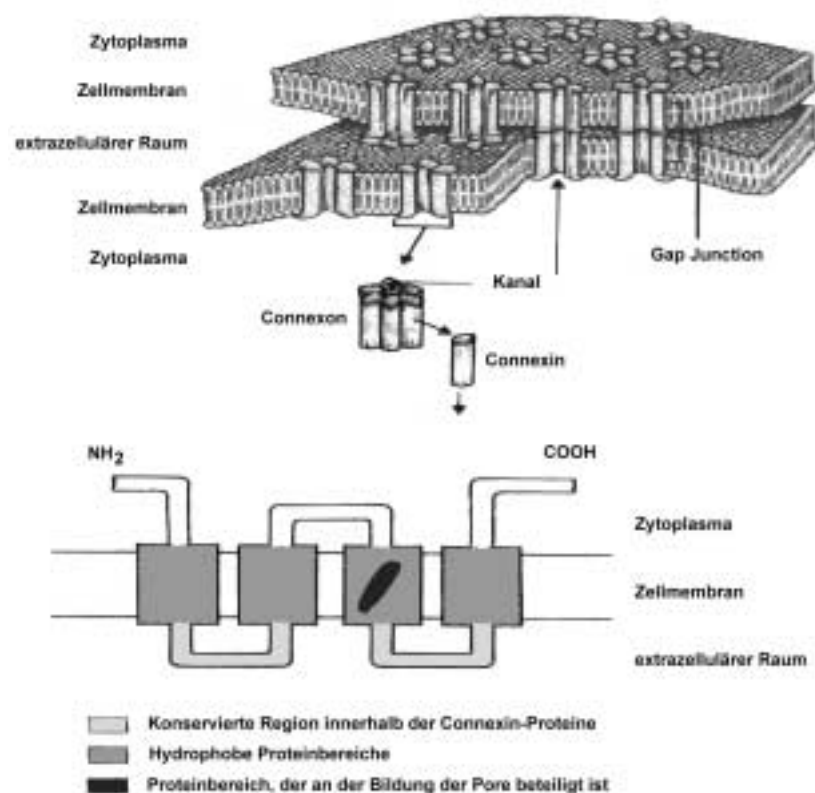


Abb. 2: Aufbau und Struktur von Gap-junctions und ihrer Proteinuntereinheiten, den Connexinen (modifiziert nach Yamasaki, 1991).

Es gibt unterschiedliche Kanaltypen, die aus verschiedenen Connexinen aufgebaut sind. Ihre Verteilung ist gewebs- und zellspezifisch (Dermietzel et al., 1990). Insgesamt unterscheidet man bislang 15 Isoformen der Connexine (Dhein, 1998), wobei diskutiert wird, inwieweit Gap-junction-Kanäle ausschließlich aus einem Connexintyp (homolog) oder aus zwei verschiedenen Connexin-Halbkanälen (heterolog) bestehen können. Experimentell konnte die Funktionsfähigkeit heterologer Kanäle an transfizierten Zellen gezeigt werden (Elfgang et al., 1995). Dabei führen aber nur bestimmte Kombinationen zu funktionsfähigen Kanälen. Da bestimmte Gewebe nur bestimmte Connexine exprimieren, ergibt sich hieraus die Möglichkeit zur Bil-

derung von Kommunikationskompartimenten *in vivo*. So kann eine Kompartimentierung entstehen mit zwei Kompartimenten in einem Gewebe, die nicht miteinander kommunizieren, obwohl die Zellen innerhalb jedes Kompartimentes untereinander gekoppelt sind. Des weiteren wird angenommen, daß der Aufbau heterologer Zell-Zell-Kommunikation zwischen Tumorzellen und Endothelzellen eine Erklärung für die starke Metastasierung mancher Tumore, wie z.B. das Chorionkarzinom darstellen könnte.

Gegenstand der Forschung ist außerdem die Frage nach der Existenz sog. heteromerer Halbkanäle, d.h. ob ein Connexin sich nur aus sechs identischen Connexinen (homomere) oder auch aus gemischten Connexintypen (heteromere) zusammensetzt (Stauffer, 1995).

Die Baupläne für die Connexine sind auf verschiedenen Genen gespeichert (Haefliger et al., 1992). Die Multigenfamilie der Connexine läßt sich in zwei Gruppen einteilen, die sich in der Länge des N-Terminus um eine Aminosäure unterscheiden. Gruppe I α umfaßt die Connexine Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx32, und Gruppe II β Cx37, Cx38, Cx40, Cx42, Cx43, Cx45, Cx46, Cx50, Cx56 (Benett et al., 1995).

Die Connexin-Isoformen werden nach ihrem unterschiedlichem Molekulargewicht bezeichnet. Dieses ergibt sich hauptsächlich aus den variablen Längen des C-Terminus. Zum Beispiel steht Cx43 für ein Connexin mit 43 kDa Molekulargewicht. Einige dieser Isoformen sind gewebetypisch (z.B. Cx30.3 in der Haut und Cx50 in der Linse), andere treten in zahlreichen Geweben auf (s. Tabelle 1). So hat Cx43 beispielsweise ein sehr ubiquitäres Expressionsspektrum.

Connexin-Isoform	Molekulargewicht	c-Terminus	Leitfähigkeit	Gewebe
Cx26	21 – 26 kDa	18 AS	140 – 150 pS »substates«: 70, 110 pS	Leber, Leptomeningozyten, Pankreas, Endometrium, Lunge, Niere, Milz, Magen, Darm, Hoden, Keratinozyten
Cx32	32 Da	76 AS	k.A.	Leber, Magen, Hirn, Niere, Pankreas, Oligodendrozyten, Schwann-Zellen
Cx37	37 kDa	107 AS	»substates«: 219, 165, 123, 53 pS	Lunge, Gefäßendothel
Cx40	40 – 42 kDa	134 AS	198 pS diverse »substates« »residual state«: 36 pS	Atrium, kardiales Reizleitungssystem, Endothel, Lunge
Cx43	43 kDa	156 AS	90, 61, 31 pS	Herz, Uterus, glatte Muskelzellen, Niere, Auge, Epithel, Leber, Milz, Ovarien, Fibroblasten, Astrozyten, Leptomeningozyten, Endothel, Perizyten
Cx45	45 kDa	396 AS	32, 22.5 pS	Herz, Lunge, Haut, Niere

AS = Aminosäure, pS = pico-Siemens (SI-Einheit der Leitfähigkeit)

Tab. 1: Kennwerte und Gewebeverteilung der häufigsten Connexin-Isoformen. Unter Leitfähigkeit ist die Einzelkanalleitfähigkeit angegeben, ggf. die der verschiedenen "substates". (k. A. = keine Angabe)

(aus Dhein, Dtsch. Med. Wschr., 1998)

Nicht nur die Struktur der Gap-junctions zeigt stark konservierte Bereiche, sondern auch ihr genomischer Aufbau. Alle bisher untersuchten Connexin-Gene bestehen aus zwei Exons, die durch ein Intron variabler Länge getrennt sind. Die kodierende Region liegt vollständig in Exon2, die Funktion des vergleichsweise kleinen Exon1 ist bisher nicht bekannt.

Die starke Konservierung der Cx-Proteine läßt sich in der Phylogenese wiederfinden. Beispielsweise ist das Cx43 des Menschen ebenso aus 382 Aminosäuren zusammengesetzt wie das Cx43 der Ratte. In nur neun Aminosäuren besteht keine Übereinstimmung.

Connexine werden im rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert, posttranslational modifiziert und noch im rER in die Membran inseriert und gefaltet. Schließlich findet die Oligomerisierung im trans-Golgi-Apparat zu den Hexameren statt (Musil und Goode-nough, 1995). Diese Hemikanäle werden dann in die Plasmamembran eingebaut und bewegen sich in der cholesterin-reichen Domäne, bis sie auf einen Hemikanal der Nachbarzellen treffen. Gap-junction-Kanäle besitzen einen raschen "Turn-over", der in einer relativ kurzen Protein-Halbwertszeit von 1-3 Stunden zum Ausdruck kommt. Sie werden in der Doppelmembran internalisiert und in Lysosomen und Proteosomen weiter abgebaut (Laird, 1996).

1.2 Funktion, Regulation und pathogenetische Bedeutung der Gap-junctions

Die aus verschiedenen Connexinen aufgebauten Kanäle unterscheiden sich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften, d.h. in ihrer Permeabilität (Elfgang et al., 1995), ihrer Einzelkanalleitfähigkeit und Spannungsabhängigkeit (Waltzmann und Spray, 1995). Die Leitfähigkeit der Gap-junction-Kanäle kann durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert werden. Beispielsweise wird die Einzelkanalleitfähigkeit und Offen-Wahrscheinlichkeit durch Phosphorylierungsprozesse verändert (Kwak et al., 1996). Außerdem können die Kanäle interessanterweise durch die Ionen reguliert werden, für die sie permeabel sind, so Ca^{2+} , Na^+ und H^+ . Diese führen zu einer reduzierten Leitfähigkeit, wie auch ATP-Mangel, intrazelluläre Azidose, ansteigendes pCO_2 , Arachidonsäure und zahlreiche lipophile Substanzen wie Heptanol, Octanol, Halothan und Ethrane (Dhein, 1998; Burt und Spray, 1988).

Die rezeptorvermittelte Stimulation von Proteinkinasen, die durch Phosphorylierungsreaktionen die Gap-junction-Leitfähigkeit regulieren, ist besonders am Herzen untersucht worden (Dhein, 1998). Dort führt in vielen Spezies die Stimulation von β -Adrenozeptoren via cAMP und Proteinkinase A zu einer verbesserten Kopplung. Im Myokard des Herzens befinden sich Gap-junctions vorzugsweise an den Glanzstreifen und verbinden die einzelnen Muskelzellen zu einem elektrischen Synzytium (Spray und Burt, 1990). Sie gewährleisten damit eine gerichtete Erregungsausbreitung von Aktionspotentialen (Delmar et al., 1987). Kommt es im Herzen zu einem teilweisen Verschluß von Gap-junction-Kanälen, wie es bei einer Hypoxie, Ischämie oder Azidose z.B. nach Myokardinfarkt der Fall ist, dann breitet sich das Aktionspotential irregulär aus und es treten Herzrhythmusstörungen bis hin zum Herzkammerflimmern auf. Experimentell ließ sich dies durch die prophylaktische Gabe eines antiarrhythmischen Peptides inhibieren, welches die Gap-junction-Leitfähigkeit erhöht (Müller et al., 1997). Andererseits dient das Schließen der Gap-junctions nach Beginn einer Ischämie dem

Schutz des umliegenden Myokards, indem es die Ausbreitung der Azidose in nicht geschädigte Areale verhindert. Die Bedeutung von Gap-junction im Reizleitungssystem des Herzens wird an Untersuchungen von Mäusen deutlich, deren Cx40-Gen inaktiviert wurde. Es kam zu einem partiellen Block im Leitungssystem, der zu einer unkoordinierten Erregung der Ventrikel führte (Simon et al., 1998).

Ein weiteres Beispiel Connexin-gesteuerter elektronischer Kopplung von Zellen ist der vermehrte Einbau von Cx43 in der Uterusmuskulatur vor Beginn der Geburtswehen. Auf diese Weise entsteht ein elektrisches Synzytium im Myometrium, welches das elektrische Signal zur synchronen Kontraktion während der Wehen ungehindert und verzögerungsfrei von Zelle zu Zelle weiterleitet.

Des weiteren konnte bei einigen angeborenen Herzfehlern die pathogenetische Bedeutung von Mutationen in Connexingenen herausgestellt werden. Beispielsweise konnten kardiale Mißbildungen bei der viszeroatrialen Heterotaxie auf Mutationen im C-Terminus des Cx43 zurückgeführt werden (Britz-Cunningham et al., 1995). In Cx43 “Knock out”-Experimenten von Mäusen fand zwar eine normale Entwicklung der Mäuse bis zur Geburt statt, mit Einsetzen der Atmung verstarben sie jedoch unter Zeichen eines Versagens des pulmonalen Gasaustausches. Ursache war eine Ausweitung des pulmonalen Ausflußtraktes mit zahlreichen intraventrikulären Septen der rechten Herzkammer, was dazu führte, daß nicht ausreichend Blut in die Lunge gepumpt werden konnte (Reaume et al., 1995).

Gap-junctions sind auch an der elektrischen Kopplung zwischen Synapsen von Nervenzellen beteiligt (Faber et al., 1993). Cx32 wurde in Oligodendroglia und Neuronen der motorischen Areale gefunden. Im Neostriatum führt ein Verlust dopaminerger Stimulation zu einer verstärkten Cx32-mRNA-Transkription mit der Folge einer erhöhten zellulären Kopplung (Fisher et al., 1990). Dies zeigt die Bedeutung von Dopamin bei der Regulation der Connexinexpression und ist v.a. in Zusammenhang des M. Parkinson interessant. Cx43 fand sich in Astrozyten und ependymalen Zellen (Fisher et al., 1993).

Eine weitere Erkrankung, bei der Cx32 eine Rolle spielt, wurde 1993 am peripheren Nervensystem festgestellt. Das X-chromosomal vererbte Charcot-Marie-Tooth-Syndrom (CMTX) wird durch Mutation des Cx32-codierenden Gens verursacht und führt zu Muskelatrophie durch Degeneration der peripheren Nerven. Cx32 wird von den Schwann’schen Zellen, den Ranvier’schen Schnürringen und an den Schmidt-Lantermann-Inzisuren exprimiert und gewährleistet kurze Diffusionswege zwischen dem Zytoplasma der Schwann’schen Zelle und dem periaxonalen Zytoplasma (Paul, 1995).

Eine sehr wichtige Funktion von Gap-junctions ist die Weiterleitung von Metaboliten und Signalen wie second messenger und Mediatoren. Dies wird in der Versorgung der Augenlinse besonders deutlich. Die Linse verfügt über zahlreiche Gap-junctions, die für den Austausch von Nährstoffen essentiell sind, da die Linse frei von Blutgefäßen ist (Goodenough et al., 1980). Inaktivierungsexperimente von Cx46 führte bei Mäusen zur Entwicklung von Katarakten (Gong et al., 1996). Bei der Weiterleitung von Noradrenalin signalen in der Leber scheint Cx32 eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Mobilisation von Glukose aus den Glykogenvorräten nach sympathischer Stimulation ist bei Cx32-defizienten Mäusen deutlich verringert (Nelles et al., 1996). Für Blutgefäße wird vermutet, daß die sog. “upstream Regula-

tion" des Vasotonus, d.h. die Ausbreitung von Mediatoren entgegen der Richtung der Blutströmung, Gap-junction-vermittelt ist (Christ et al., 1996). Das Ausmaß der Sekretion exokriner Drüsen, wie z.B. des Pankreas oder der Speicheldrüsen wird ebenfalls durch Gap-junctions reguliert, wobei vermehrte Sekretion mit Entkopplung assoziiert ist (Chanson und Meda, 1993).

Im Rahmen von Entzündungsprozessen sind Gap-junctions bei der Interaktion zwischen Zellen der Gefäßwand und Entzündungszellen beteiligt. Bakterielle Lipopolysaccharide bewirken, daß Leukozyten, die normalerweise zu den Zellen gehören, die keine Gap-junction zur Kommunikation besitzen, im Verlauf einer Entzündung Cx43 exprimieren. Diese Expression ist vermutlich für Endothel-Leukozyten-Kontakte sowie für Kontakte unter den Leukozyten verantwortlich (Jara et al., 1995).

Im Ovar scheint Cx37 essentiell für die Ovulation zu sein. Der Gap-junction-Kanal wird zwischen Oozyten und Granulosazellen exprimiert. Cx37 defiziente Mäuse waren infertil, da anstelle von reifen Follikeln es zur Bildung zahlreicher, kleinerer Gelbkörper kam (Simon et al., 1997).

2. Die Plazenta und die Rolle von Gap-junctions bei der Trophoblastentwicklung

Während der Gravidität entwickeln alle Säugetiere ein lebensnotwendiges Organ, welches den mütterlichen Organismus mit dem Fötus verbindet und den Stoffaustausch zwischen mütterlichem und embryonalem Kreislauf ermöglicht, die Plazenta.

Beim Aufbau dieses Organs, der Plazentation, invadieren embryonale Trophoblastzellen in das mütterliche Endometrium, um einen schnellen und direkten Kontakt mit dem maternalen Blut herzustellen. Dabei kommt es zu einem teilweisen Abbau des Endometriums und einer Arrosion maternaler Gefäße. Auf diese Weise kommt es zur Ausbildung einer sog. hämocho-rialen Plazenta.

Vorraussetzung für die Implantation des Embryos ist die Fähigkeit des Trophoblasten zur Proliferation und Invasion. Dieser Vorgang unterliegt einer strikten räumlichen und zeitlichen Regulation durch das maternale Gewebe. Die Dezidua verfügt über regulative Potenz, um das Vordringen des enzymatisch hochaktiven Trophoblasten zu begrenzen.

Gap-junctions als Vermittler der direkten Zell-Zell-Kommunikation spielen bei der Abgrenzung von Gewebekompartimenten sowie bei Proliferations- und Differenzierungsprozessen eine wichtige Rolle (Winterhager, 1993 und 1996; Reuss et al., 1997). Gezielte Mutationen an diesen Regulationsmechanismen führen zu Fehlentwicklungen der Plazenta und zum Absterben des Embryos in utero (Copp et al., 1995).

Die Trophoblastzellen durchlaufen während der Implantation und Plazentation verschiedene Differenzierungsstufen, wobei Trophoblastsubpopulationen mit unterschiedlichen Aufgaben entstehen (Pijnenborg et al., 1980).

Bei der humanen Plazentaentwicklung hat sich zum Zeitpunkt der Implantation die befruchtete Eizelle bereits in Embryoblast und Trophoblast differenziert. Durch interzelluläre Flüssigkeitsansammlung im Zentrum der Morula ist die Blastozyste entstanden. Während sich aus

dem Embryoblast Embryo, Nabelschnur und Strukturen der Dottersackmembran entwickeln, heftet sich der Trophoblast an das Uterusepithel an und wächst in dieses zur Bildung der Plazenta ein (Abb. 3).

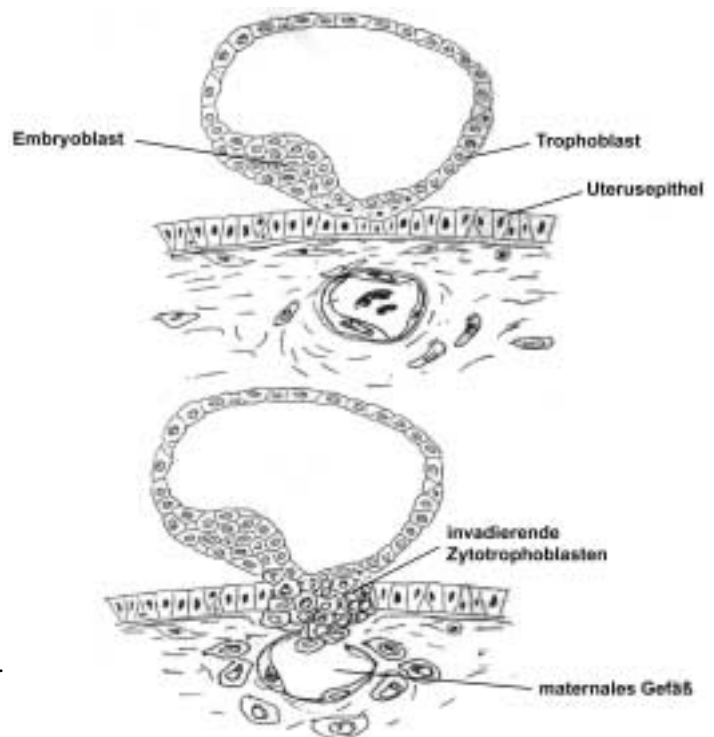


Abb. 3:

Adhäsion, Invasion und nachfolgende Arrosion von maternalen Gefäßen durch den Zytotrophoblasten, (modifiziert nach Kaufmann, 1983).

Bereits am 8. Tag, unmittelbar nach der Implantation, findet eine Differenzierung des Trophoblasten in Zyto- und Synzytiotrophoblast statt (Stegner, 1996). Die soliden invadierenden Trophoblastzapfen werden als Primärzotten bezeichnet, welche durch trabekuläre Aussprossungen der Zellen des Zytotrophoblasten gebildet werden. Diese Primärzotten sind außen vom Synzytiotrophoblasten umhüllt. Diese Zellpopulation stellt einen kontinuierlichen, multinukleären Zellschlauch dar, in dem keine Kernteilungen mehr stattfinden und der sich durch Wachstum und spätere synzytiale Verschmelzung des darunterliegenden villösen Zytotrophoblasten regeneriert. Der Synzytiotrophoblast besitzt enzymatische Aktivität, welche die mütterlichen Kapillaren arrodieren. Dies führt zu einem kommunizierenden Lakunensystem, in dem die fetalen Zotten in unmittelbarem Kontakt mit maternalem Blut stehen (Stegner, 1996).

Durch Einsprossen von extraembryonalem Mesenchym entwickeln sich aus den Primärzotten, Sekundärzotten, die sich im Zuge der fetalen Kapillarisierung in Tertiärzotten differenzieren. Auf diese Weise entwickelt sich ein Zottenbaum, der in das frei zirkulierende maternale Blut eintaucht (Abb. 4). Im Laufe der Gravidität verschmälert sich die Zytotrophoblastschicht, der Zottendurchmesser verkleinert sich und die Zottenkapillaren verschieben sich randständig. So wird die Diffusionsbarriere, die sog. Plazentaschranke, zwischen den fetalen Kapillaren und den maternalen Blutsinus, dem sog. intervillösen Raum, auf ein Minimum reduziert (von 0,025 mm zu Beginn bis auf 0,002 mm am Enden der Schwangerschaft).

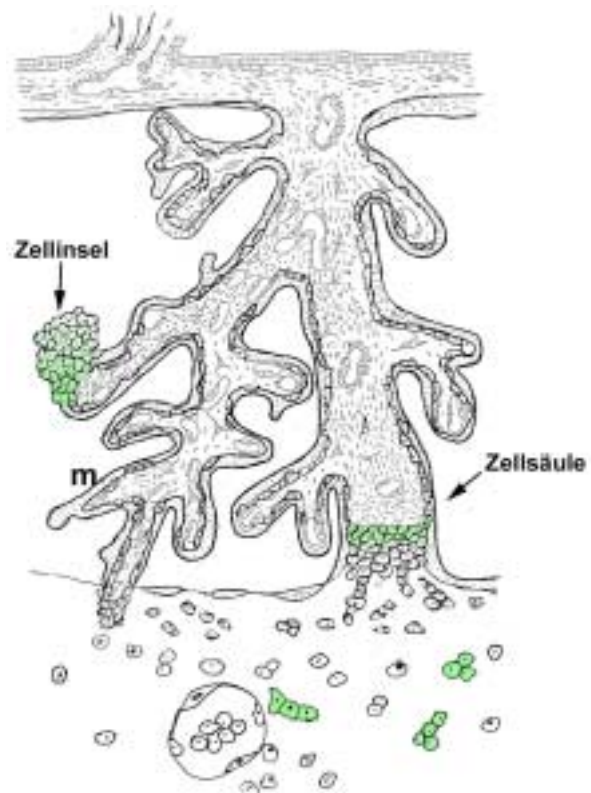
Der Synzytiotrophoblast dient mit zahlreichen Carrier- und Transportmechanismen für den Glukose- und Eiweißstoffwechsel nicht nur dem feto-maternalen Austausch, sondern besitzt

auch endokrine Funktionen, wie die Synthese von hCG, hPL bzw. hCS sowie aus Vorstufen Östrogene und Progesteron (Kliman et al., 1986).

Bei den Zytotrophoblastzellen unterscheidet man hochdifferenzierte villöse und invasive extravillöse Zellpopulationen (Ohlsson, 1989). Zum extravillösen Trophoblasten zählt man Zellinseln und Zellsäulen, die sich durch ständige Proliferation auszeichnen (Abb. 4). Zellinseln findet man v.a. an den Stammzottenabgängen der Chorionplatte und an den Stammzotten in der Nähe der Basalplatte. Als Zellsäulen bezeichnet man die Areale, in denen Haftzotten mit dem maternalem Gewebe, der Dezidua, verbunden sind. Basalwärts lösen sich einige Trophoblastzellen aus den Zellsäulen ab und dringen in die Basalplatte ein.

Abb. 4:

Schematischer Ausschnitt eines Zottenbaums mit Verankerung einer Plazentazotte durch eine Haftzotte in der maternalen Dezidua. Mit Pfeilen dargestellt ist eine durch stetige Proliferation gekennzeichnete Zellinsel und Zellsäule des sog. extravillösen Trophoblasten, (modifiziert nach Castellucci et al., 1991).
v = fetale Kapillare, f = Fibrinoid,
m = mesenchymaler Villus, c = Haftzotte,
e = peripherer Villus.



Gap-junctions sind an diesen Vorgängen entscheidend beteiligt. Die proliferativen Eigenschaften der Zellinseln und Zellsäulen sind mit einer Expression von Cx40 gekoppelt (von Ostau, 1997). Diejenigen Zellen der Zellsäulen, die in die Dezidua migrieren, also vom proliferativen zum invasiven Charakter übergehen, verlieren die Cx40-Expression. Bei erneuter Zellaggregation in der Dezidua kommt es wieder zu einer Cx40-Reexpression (Winterhager et al., 1999).

Die Abgrenzung solcher Kompartimente bzw. Proliferationszonen durch Gap-junctions lässt sich auch in der Plazentaentwicklung anderer Spezies wiederfinden. Reuss und Mitarbeiter (1997) haben das Expressionsmuster von Connexinen bei der Implantation und Plazentation der Ratte untersucht. So bildeten sich zum Zeitpunkt der Implantation zwei Kommunikationskompartimente, an denen Cx31 und Cx43 beteiligt waren und die untereinander keine funktionellen Kanäle ausbilden können (Elfgang et al., 1995). Die Expression von Cx31 beschränkte sich auf die invasiven und proliferativen Trophoblastzellen der Plazentaanlage, nämlich den Ektoplazentar-Konus, während der aus der inneren Zellmasse hervorgehende

Embryo eine Cx43-Expression aufwies. Beide Cx-Typen konnten in der Blastozyste vor der Implantation noch in beiden Zellpopulationen nachgewiesen werden.

Die spätere Differenzierung der Trophoblasten in verschiedene Subpopulationen war mit einem Wechsel der Connexin-Expression verbunden. Im sog. labyrinthären Abschnitt konnte eine Cx26-Expression detektiert werden, die mit einem diaplazentaren Glukosetransport und anderer Metabolite in Verbindung gebracht wurden (Gabriel, 1998). Der Spongiotrophoblast und die Trophoblast-Riesenzellen zeichneten sich durch eine Cx43-Expression aus (Reuss et al., 1997).

Die Beispiele der Plazentaentwicklung an Mensch und Ratte zeigen, wie eng Differenzierungsprozesse und Bildung von Kompartimenten mit der Expression von Connexinen verbunden sind.

3. Das Chorionkarzinom

Das Chorionkarzinom ist in Europa im Gegensatz zu Asien ein eher seltener, von der Plazenta bzw. dem Trophoblasten ausgehender Tumor. Er zeichnet sich durch stark invasives und destruierendes Wachstum aus, neigt zu rascher hämatogener Metastasierung und produziert in großen Mengen β -hCG.

Etwa die Hälfte aller Chorionkarzinome entsteht aus einer Blasenmole, einer durch abnorme Eizellbefruchtung entstandenen Wucherung des Trophoblasten. Etwa ein Drittel findet man im Anschluß an einen Abort, 25% nach intrauteriner Schwangerschaft und 2% nach Tubargravidität. Die meisten Chorionkarzinome entstehen innerhalb von 2 Jahren nach vorangegangener Schwangerschaft. Alte Erstgebärende sind am stärksten gefährdet (Torhorst, 1995).

Vaginale Blutungen nach Amenorrhoe ist das häufigste Symptom. Seltener sind Schwellungen des Leibes oder Knotenbildungen in der Vagina und am äußeren Genitale (Stegner, 1996). In anderen Fällen wird das klinische Bild durch die Metastasierung bestimmt. Das Chorionkarzinom bricht häufig in die Blutbahn ein und metastasiert vornehmlich in die Lunge (80%). Lungensymptome wie Dyspnoe und Hämoptysis finden sich in ca. 3% der Fälle (Schmidt-Matthiesen und Bastert, 1982). Metastasierungsziele sind auch Vulva und Vagina (30%), kleines Becken (20%), Leber und meist im Finalstadium Gehirn (10%).

Makroskopisch sind Primärtumor und Metastasen durch ihren schwammig-hämorrhagischen Aspekt charakterisiert. Im Uterus wächst der Tumor polypös und/oder invasiv ins Myometrium. Histologisch besteht das Chorionkarzinom aus atypischen Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten, die einen Resorptionsbürstensaum aufweisen. Der Tumor infiltriert Myometrium und Blutgefäße (Torhorst, 1995).

Das Invasionsvermögen des Trophoblasten wurde häufig mit Tumorzellen verglichen (Yagel, 1989; Strickland und Richards, 1992). Durch die regulative Schutzfunktion des maternalen Gewebes unterscheidet sich jedoch die kontrollierte Invasion des Trophoblasten vom schrankenlosen, infiltrativen Wachstum eines malignen Tumors. Trotzdem werden humane Chorionkarzinomzelllinien als *in vitro*-Modell für die Invasion des Trophoblasten während der frühen Phase der Plazentaentwicklung verwendet (Grümmer, 1991).

Neben einigen tumorspezifischen Eigenschaften, wie Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, starke Unregelmäßigkeiten in Kernform- und Kerngröße (Knoth et al., 1969), Chromosomenanomalien (Takamizawa und Sekiya, 1984), spezielle Enzymmuster (Patillo et al., 1970) sowie die Überexpression von Proto-Onkogenen (Landers et al., 1994) weisen Chorionkarzinomzelllinien auch zahlreiche gemeinsame, funktionelle und morphologische Charakteristika von Trophoblastzellen auf.

Beide Zelltypen besitzen eine große Zahl proteolytischer Enzyme, um die Basalmembran zu durchdringen und in die extrazelluläre Matrix zu invadieren. Hierzu zählen die Urokinase, Plasminogen-Aktivator, Typ IV-Kollagenase sowie Metalloproteinasen (Strickland et al., 1976; Librach et al., 1991; Behrendtsen et al., 1992).

Chorionkarzinome synthetisieren wie Trophoblastzellen Plazentahormone wie Östradiol, Progesteron und β -hCG (Patillo et al., 1968). Als Syntheseort des trophoblasttypischen Hormons β -hCG wird der Synzytiotrophoblast vermutet (Midgley und Pierce, 1962). Chorionkarzinomzelllinien zeichnen sich durch eine inhomogene, morphologische Variabilität ihrer Zellpopulationen aus. Sie setzen sich aus unterschiedlich differenzierten Zellen zusammen, wie man sie auch im Trophoblasten der unreifen und reifen Plazenta findet (Kurman et al., 1984), nur ist beim Chorionkarzinom der topologische Aufbau im Gegensatz zu den Zotten der Plazenta mit dem innen liegenden Zytotrophoblasten, die von dem außen anliegenden Synzytiotrophoblasten bedeckt werden, nicht vorhanden. Es finden sich zytotrophoblast-ähnliche Zellen und differenzierte Zellen mit einer Synzytiotrophoblast-ähnlichen Morphologie. Letztere gehen mit einem größeren Organellenbestand einher (Kurman et al., 1984). Insbesondere ein hoher Gehalt an endoplasmatischem Retikulum zeigt sich für ein elektronendichteres Zytoplasma als bei undifferenzierten Zellen verantwortlich und zeugt davon, daß die differenzierten, Synzytiotrophoblast-ähnlichen Zellen Produktionsstätte von β -hCG und anderen Plazentahormonen sind. Die Menge der Hormonproduktion kann damit mit dem Differenzierungsgrad des Chorionkarzinoms korreliert werden. Loke und Mitarbeiter (1983) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß ein fließender morphologischer Übergang von Zyto- zu Synzytiotrophoblastzellen mit einer kontinuierlichen Zunahme der Hormonproduktion einhergeht.

In diesem Zusammenhang ist auch die gemeinsame Sensibilität von Chorionkarzinomzellen und Trophoblastzellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Methotrexat sowie gegenüber Retinsäure interessant. Beide Substanzen führen zu einer erhöhten Differenzierung der Zellen. Insbesondere bei der Therapie maligner Trophoblasttumoren ist die Chemotherapie das Mittel der Wahl. Trotz des aggressiven und frühzeitigen Metastasierungspotentials des Chorionkarzinoms führt die Behandlung mit Methotrexat zu Remissionsraten, die 100% erreichen können. Für diese bei malignen Tumoren ungewöhnlich hohe Remissionsraten wird nicht allein die zytostatische Wirkung des Folsäureantagonisten diskutiert, sondern auch eine Stimulation der Differenzierung von Zyto- zu Synzytiotrophoblasten (Friedmann et al., 1984).

Untersuchungen zur Connexinexpression an den drei Chorionkarzinomzelllinien BeWo, Jeg-3 und JAr von Hellmann (1996) spiegelten die Inhomogenität des Chorionkarzinoms wieder. In allen drei Zelllinien konnte zwar eine Cx40-Expression detektiert werden, diese war jedoch äußerst inhomogen (BeWo) und in ihrem Ausmaß unterschiedlich. Während Jeg-3-Zellen

lediglich auf mRNA-Ebene geringe Cx40-Transkripte aufwiesen, zeigten sich bei BeWo und JAr-Zellen eine auf Proteinebene immunhistochemisch sichtbare Cx40-Expression. JAr-Zellen exprimierten zusätzlich geringe Mengen von Cx43.

Diese inhomogene Expression von Cx40-Proteinen wird, ähnlich wie die hCG-Produktion, auf den unterschiedlichen Differenzierungsgrad der malignen Trophoblastzellen zurückgeführt (Hellmann, 1995). Da der trophoblastische Ursprungsort der humanen Chorionkarzinomzelllinie unbekannt ist, führte die Detektion der Cx40-Expression zu der Vermutung, daß der extravillöse Trophoblast mit seinen Zellinseln und Zellsäulen Ausgangsmaterial für Chorionkarzinome sein könnte.

Beide Zellformen zeichnen sich durch stetige Proliferation aus. Weitere Gemeinsamkeiten wie zellspezifische Markermoleküle (c-erbB 2 oder EGF-Rezeptor) sowie die verlängerte Halbwertszeit des Tumorsuppressor-Gens p53 bei fehlender Mutation, bestätigen eine Verwandtschaft dieser Gewebetypen (Marzusch et al., 1995; Landers et al., 1994; Mühlhauser et al., 1993).

Neben diesen Gemeinsamkeiten von humanen Chorionkarzinomzellen und Trophoblastzellen besteht jedoch der Unterschied in der kontrollierten Invasivität des Trophoblasten *in vivo*. Welche Regulations- und Schutzmechanismen im einzelnen an der Begrenzung des Invasions- und Proliferationsvermögens beteiligt sind, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Daß Gap-junctions, die Vermittler der direkten Zell-Zell-Kommunikation, bei der Implantation eine wichtige regulative Funktion übernehmen, wurde bereits beschrieben.

Durch Transfektion von Cx-Genen in die Chorionkarzinomzelllinie BeWo sollte sich zeigen, ob die Ausbildung von Gap-junctions auch zu einer Kontrolle von Proliferation und Invasion einer malignen Trophoblastzelllinie *in vitro* wie *in vivo* führt.

Diese Chorionkarzinomzelllinie ist aufgrund ihrer endogenen Connexin-Ausstattung gut geeignet, um durch Transfektionsexperimente der Frage nach einer kontrollierten Proliferation und Differenzierung mittels Gap-junctions nachzugehen.

In Untersuchungen an Chorionkarzinomzelllinien (Hellmann et al., 1995 und 1996) wurde nachgewiesen, daß die parentale BeWo-Zelllinie eine heterogene endogene Expression von Cx40 aufweist. RNA-Analysen (Northern Blot und RT-PCR) bestätigten eine ausreichende Transkriptionsrate. Zudem konnte immunhistochemisch eine inhomogene Expression von Cx40-Proteinen im Zellmonolayer aufgezeigt werden.

Transfektionsexperimente mit Cx40 würden eine wesentlich homogenere Zellpopulation erwarten und somit einen Effekt auf Proliferation und Invasion vermuten lassen. Eine Cx26- und Cx43-Expression in der parentalen BeWo-Zelllinie konnte nicht nachgewiesen werden. Somit erweisen sich die BeWo-Zellen für diese Transfektionsstudien als besonders geeignet, um die Rolle der Zell-Zell-Kommunikation mittels Gap-junctions auf Proliferation, Invasion und Differenzierung zu untersuchen.

4. Gap-junction und Tumorgenese

Es gibt zahlreiche experimentelle Befunde, welche die Bedeutung von Gap-junctions bei der Kontrolle von Proliferations- und Invasionsvorgängen herausstellen.

Yamasaki (1991) stellte die Hypothese auf, daß als Folge eines Defizits direkter zytoplasmatischer Zell-Zell-Kommunikation keine Wachstumskontrolle von Tumorzellen mehr möglich ist und diese daraufhin klonal wachsen und sich aus dem Gewebsverband lösen. Dabei kann es sowohl zu einem Verlust der Kommunikationsfähigkeit von Tumorzellen untereinander (homozelluläre Kommunikation) als auch mit dem benachbarten Gewebe (heterozelluläre Kommunikation) kommen.

Ein Verlust der homozellulären Kommunikation ist von zahlreichen Autoren für verschiedene Tumore beschrieben worden (Wilgenbusch et al., 1992; Krutovskikh et al., 1994; Grossmann et al., 1994). Bereits 1966 konnten Loewenstein und Kanno an Lebertumorzellen zeigen, daß diese nicht kommunizieren. Die Aktivierung von Tumorpromotoren und Onkogenen führt in diesen Studien zu einer Inhibition zellulärer Kommunikation. Umgekehrt kann eine Überexpression von Connexinen durch Transfektion maligner, kommunikationsdefizienter Zelllinien eine Wachstumskontrolle und ein Verlust von Tumorigenität herbeiführen. Eine Transfektion mit Cx43 führte in nicht-kopplungskompetenten 10T1/2 Zellen zu einer Verstärkung der Kommunikation und reduzierter Proliferation (Mehta et al., 1991). Eine Überexpression von Cx26, welches natürlicherweise in Zervixzellen vorhanden ist, bewirkte in kommunikationsdefizienten HeLa-Zervixkarzinomzellen eine starke Reduzierung ihrer Zellteilungsrate (Mennil et al., 1995). Weitere Untersuchungsbefunde unterstreichen die Bedeutung von Gap-junctions bei Verlust von Wachstumskontrolle und Differenzierung (Eghbali et al., 1991; Rose, 1993, Omori, 1998). Des weiteren können Retinoide und Carotenoide die zelluläre Kommunikation und Cx-Expression erhöhen und auf diese Weise die Tumorgenese *in vitro* inhibieren (Hossain et al., 1993).

In vivo konnte an Lebertumoren von Mäusen die Rolle von Cx32 als Tumorsuppressorgen und der Verlust homozellulärer Kommunikation an der Beteiligung der Tumorgenese verdeutlicht werden. Cx32-defiziente Mäuse entwickelten deutlich mehr spontane und durch Diethylnitrosamin induzierte Lebertumoren als ihr Wildtyp (Temme et al., 1997).

Der Verlust der heterozellulären Kommunikation zur Umgebung kann durch Schließen von Gap-junction-Kanälen infolge Einwirkung von Tumorpromotoren wie Phorbol ester induziert werden (Klaunig und Ruch, 1990) sowie durch Veränderung der Connexin-Expression und Bildung inkompatibler Connexine erfolgen (Krutovskikh et al., 1994; Oyamada et al., 1995).

Yamasaki (1995) machte folgende molekularen Mechanismen verantwortlich, die zu einer defizienten Zellkommunikation via Gap junctions führen können: Mutation von Connexin-Genen, reduzierte oder fehlerhafte Expression von Connexin mRNA, atypische Lokalisation von Connexin-Proteinen (z.B. intrazytoplasmatisch), durch Phosphorylierung abweichende Cx-Proteine und Veränderung der Connexin-Funktion durch andere Proteine, die an der Zell-Adhäsion beteiligt sind.

Darüber hinaus gibt es Studien, die gerade die Fähigkeit zur Ausbildung heterozellulärer Kommunikation für die Invasion von Tumorzellen verantwortlich machen. Dies wurde in *in-*

vitro Invasionsassays von Tumorzelllinien in vorkultivierten Hühnerherzfragmenten und Gefäßendothel-Monolayern demonstriert (El-Sabban und Pauli, 1991; Grümmer et al., 1994).

Andererseits gibt es Untersuchungen an bestimmten Gliomzellen und Melanomzellen, die keinen Zusammenhang zwischen invasivem Wachstum und Gap-junction-Kommunikation aufzeigen (Heilige et al., 1997 und Singh et al., 1997). Auch gibt es Arbeiten, die keine Einschränkung der direkten Zell-Zell-Kommunikation in Tumorzellen feststellen (Holtz-Wagenblatt und Shalloway, 1993) und damit Yamasakis Hypothese widersprechen.

Dies zeigt erneut die multikausalen Zusammenhänge der Tumorgenese auf. Zwar scheint ein Verlust der Gap-junction-Kommunikation in der Karzinogenese einiger Tumoren nicht essenziell zu sein, doch führt im allgemeinen die Reduktion dieser kommunizierenden Zell-Zell-Kanäle, wie durch eine Vielzahl von Tumorpromotoren verursacht, zu einem Verlust an Differenzierungskontrolle durch die Umgebung und zu aggressivem, unkontrolliertem Wachstum.

5. Zielsetzung

An der Chorionkarzinomzelllinie BeWo soll der Einfluß der interzellulären Kommunikation durch Gap-junctions auf Proliferation, Invasion und Differenzierung untersucht werden.

Ziel der Arbeit ist es durch Einbringen verschiedener Connexin-Expressionsvektoren stabil transfizierte BeWo-Zellklone zu etablieren, die eine exogene Expression von verschiedenen Connexinen aufweisen.

An diesen Zellklonen soll die postulierte Rolle der Gap-junctions als Tumorsuppressorgene und ihre Bedeutung in der Kontrolle von Wachstum, Invasivität und Differenzierung analysiert werden.

Zur Klärung der Frage, ob sich durch Verbesserung der interzellulären Kopplung eine Reduktion der Zellteilungsrate dieser malignen Chorionkarzinomzelllinie erzielen läßt, wird eine Proliferationsstudie *in vitro* durchgeführt und die Zellteilungsrate verschiedener kommunizierender Cx-Klone mit ihren Kontrollen verglichen.

Unterschiede im Differenzierungsverhalten soll mit der β -hCG-Hormonproduktion korreliert werden.

Das Invasionsvermögen und Metastasierungspotential des Chorionkarzinoms und ihre Beeinflußbarkeit durch die Ausbildung von Gap-junctions soll *in vivo* an Nacktmäusen demonstriert werden.

Von besonderem Interesse bei diesen Untersuchungen sind die Eigenschaften des Cx40-Kanals, welcher bei bestimmten Trophoblastpopulationen der humanen Plazenta mit starker Proliferation assoziiert ist sowie die Frage, ob sich anhand der Ergebnisse der transfizierten malignen Trophoblastzellen bestätigen läßt, daß Connexine wesentliche regulative Faktoren darstellen, die für den benignen und kontrollierten Invasionsprozeß des Trophoblasten in das maternale Gewebe verantwortlich sein können.

B. Material und Methoden

1. Molekularbiologisches Arbeiten

1.1 Vektoren

Folgende Vektoren wurden für die Transfektion der Connexingene in Chorionkarzinomzellen verwendet:

1. Kommerziell erhältliche Vektoren (Basisvektoren)

pSG-5: Eukaryotischer Expressionsvektor mit dem SV40 Early Promotor und einem Polyadenylierungssignal;
Vektorgröße: 4,1 kb
(Stratagene)

pSV.SPORT1: Expressionsvektor mit dem SV40 Early Promotor und einem Polyadenylierungssignal;
Vektorgröße: 3,16 kb
(Gibco BRL)

Die Karten der Vektoren befinden sich im Anhang.

2. Expressionsplasmide für Connexine

Die für die Transfektion verwendeten Expressionsplasmide wurden von Peter Hellmann (Hellmann, 1995) konstruiert. Im Einzelnen wurden folgende Plasmide verwendet:

pPH9: In den pSV.SPORT1-Vektor wurde ein 1,2 kb großes EcoR1 cDNA-Fragment, welches den kodierenden Bereich des Ratten Cx26 enthält (Zhang und Nicholson, 1989), einkloniert.

pPH17: Der offene Leserahmen des humanen Cx43 wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und das 1,14 kb große PCR-Produkt in die BamH1 Schnittstelle des pSG-5-Vektor einkloniert (Hellmann, 1995)

pPH18: Der offene Leserahmen des humanen Cx40 wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und das 1,16 kb große PCR-Produkt in die EcoR1 Schnittstelle des pSG-5-Vektor einkloniert (Hellmann, 1995)

3. Zur Verfügung gestellte Vektoren

pBEH-pac18: Puromycin-Selektionsvektor, der für die Co-Transfektion verwendet wurde; Enthält einen etwa 1 kb großen Genabschnitt (pac-Gen), der die Puromycin-N-acetyltransferase kodiert. Von Prof. Dr. K. Willecke (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt;
Vektorgröße: 4,8 kb

1.2 DNA

1.2.1 Vermehrung und Isolierung der Expressionsplasmide und Basisvektoren

1.2.1.1 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurde der Stamm XL1-Blue verwendet, der vom Sicherheitsstamm *E. coli* K12 abgeleitet wurde.

XL1-Blue: supE44, hsdR17, rec A1, gyr A46, thi, relA1, lac⁻ F'(proAB+lacI^qlacZΔM15 Tn10(tet^r))

Die Bakterien wurden nach dem Protokoll von Sambrook et al., 1989, mit CaCl₂ behandelt, um auf diese Weise kompetente Zellen herzustellen, die somit befähigt waren, Plasmid-DNA aufzunehmen.

In jeweils 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden nun ca. 5 µg Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben.

Die Methode der Transformation und die anschließende Kultivierung des transformierten *E. coli*-Stammes wurde angewendet, um die Expressionsplasmide mit den cDNA-Fragmenten von Ratten Cx26, humanem Cx40 und humanem Cx43 sowie die beiden Basisvektoren pSG-5 und pSV.SPORT1 zu vermehren und anschließend zu isolieren.

Nach Gabe der jeweiligen Plasmid-DNA zu den kompetenten Zellen wurde das Gemisch für 30 Min auf Eis belassen und im Anschluß für 30 S bei 42°C inkubiert.

Danach wurden die transformierten Bakterien jeweils in ein Reagenzröhrchen überführt und mit 800 µl vorgewärmtes LB-Medium (siehe Anhang) aufgefüllt. Die Röhrchen wurden dann für 30 min in einen Rotationsschüttler (37°C, 190 Upm, Orbital Shaker, Scientific) inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt erneut in jeweils 1,5 ml Reaktionsgefäße zurückgeführt und diese bei 10000 Upm für ca. 1 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, Centrifuge 5415, Eppendorf).

Vom Überstand wurden 750 µl verworfen. Die restlichen 150 µl wurden schließlich mit dem Pellet resuspendiert und auf Ampicillin-Agarplatten (siehe Anhang) mit einem Drygalskispatel ausgestrichen.

Die ausgestrichenen Agarplatten wurden über Nacht in eine Wärmekammer (37°C) deponiert.

1.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA

Eine der durch die Transformation erhaltenen Bakterienkolonien wurde von der Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in ein 5 ml LB-Medium und 10 µl Ampicillin (100 µl/ml) enthaltenes Polypropylen-Röhrchen überführt.

Dieses wurde ü.N. bei 37°C und 190 Upm im Rotationsschüttler inkubiert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA in Form der Minipräparation dient der Feststellung, ob das Bakterium auch das gewünschte Plasmid mit komplettem „Insert“ aufgenommen hat.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung wurde die alkalische Lyse nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) angewendet:

1,5 ml der ü.N.-Kultur wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 1 min bei 14000 Upm in einer Tischzentrifuge beschleunigt. Der Überstand wurde verworfen und erneut 1,5 ml der ü.N.-Kultur zum Pellet gegeben und abermals abzentrifugiert.

Das Pellet wurde nun in 100 µl eiskalter GTE(I)-Lösung (siehe Anhang) resuspendiert, für 2 min bei 37°C mit offenem Deckel im Wasserbad inkubiert und dann für weitere 3 min bei RT stehengelassen.

Anschließend wurden 200 µl frisch hergestellter Lösung II (siehe Anhang) zugegeben, das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und für 5 min auf Eis belassen.

Nun wurde 150 µl einer eiskalten 3 M NaAcetat-Lösung (pH 5,2 ; siehe Anhang) zugeführt. Während des „Vortexen“ konnte man ein Ausflocken von genomischen DNA/Protein-Komplexen beobachten. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Komplexe in der Tischzentrifuge bei 14000 Upm 12 min abzentrifugiert.

Der Überstand enthielt die Plasmid-DNA und wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Um noch vorhandene Proteinbestandteile in der Plasmid-DNA zu entfernen, erfolgte eine Phenolextraktion. Dazu wurden 400 µl aus Tris-gesättigtem Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 1:1 zugegeben, der Ansatz vermischt und anschließend für 2 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation beobachtete man eine Phasentrennung in eine untere organische und obere wässrige Phase, die die aufgereinigte Plasmid-DNA enthielt.

Der wässrige Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 1 ml 100% Ethanol versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz 20 min zentrifugiert. Dann wurde der Ethanolüberstand abgesaugt und das DNA-Pellet mit 100 µl 80% Ethanol gewaschen.

Nach kurzem „Vortexen“ und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet unter Vakuum im Exsikator 5 min getrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wurde dann in 20 µl/ml RNase-haltigem H₂O bid. aufgenommen.

Der DNA-Gehalt der Probe wurde in Quarzküvetten photometrisch bestimmt (1 ml H₂O als Referenz und 995 µl H₂O mit 5 µl der Probe). Die Extinktion wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Reinheitsgrad wurde nach dem Quotienten E₂₆₀/E₂₈₀ kontrolliert und die Konzentration nach der Formel $E_{260} \times 200 \times 50 / 100$ [µg/µl] berechnet.

Die so gewonnene Plasmid-DNA konnte nun durch Restriktionsanalyse charakterisiert werden.

1.2.3 Spaltung der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen (Spaltansatz für Elektrophorese)

Die eingesetzten Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI wurden von AGS (Heidelberg) geliefert. Die entsprechenden Pufferbedingungen für die verwendeten Enzyme wurden nach mitgelieferten Tabellen des Herstellers gewählt.

Folgender Ansatz für die Restriktion wurde vorbereitet:

20 µl Gesamtvolumen:

ca. 5 µg Plasmid-DNA
2 µl Puffer
1 µl Enzym
Restmenge H₂O bid.

Der Spaltansatz wurde 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

1.2.4 Elektrophorese

Mit der Elektrophorese lassen sich Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Nettoladung in einem elektrischen Spannungsfeld der Größe nach auftrennen. Die Größenauftrennung erfolgt durch Molekularsiebeigenschaften der Matrix.

Als Matrix diente ein Agarose-Gel. In diesem Fall wurde 0,8% Agarose in TAE-Puffer zur Auftrennung angewandt. Durch Zusatz von 4 µl Ethidiumbromidlösung zum Gel, konnte später die Auftrennung der DNA unter UV-Durchlicht sichtbar gemacht werden, da Ethidiumbromid in die DNA eingebaut wird.

Als Laufpuffer kam TAE-Puffer zur Anwendung. Die durch Restriktionsverdau behandelten Proben wurden mit 0,1 Vol 6x Probenpuffer (loading buffer mit den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylencyanol, welche als Farbstoffbanden während der Elektrophorese sichtbar werden; s. Anhang) versetzt und in die Geltaschen aufgetragen.

Die erste Tasche wurde mit einem DNA-Molekulargewichtsmarker (DNA Molecular Weight Marker III; Größenstandard für DNA-Fragmente; Boehringer) versehen. Anschließend wurde eine Spannung von 80-90 V angelegt.

Nach erfolgter Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die DNA-Banden unter dem Transilluminator dokumentiert und analysiert. Durch Vergleich mit dem mitgelaufenen DNA

Molekulargewichtsmarker ließen sich die Basisvektoren und die verschiedenen cDNA-Fragmente der Connexine, je nach Gewicht, nachweisen.

1.2.5 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Nachdem durch die Minipräparation und den Restriktionsverdau mit anschließender Elektrophorese nachgewiesen wurde, daß die gepickte Bakterienkolonie auch tatsächlich das jeweilige Plasmid aufgenommen hatte, wurde von den entsprechenden Bakterienkolonien eine erneute Übernacht-Kultur zur Vermehrung in sterilen 1 Liter-Kolben angesetzt. Folgende Ansätze wurden vorbereitet:

250 ml LB-Medium
500 µl Ampicillin (100 µg/ml)
20 µl Bakterien

Anschließend erfolgte eine Inkubation im Schüttler (37°C, 190 Upm) über Nacht.

Vom Rest wurde eine Glycerinkultur zur dauerhaften Lagerung angefertigt. Dazu wurden 850 µl Bakteriensuspension mit 150 µl 87%igem Glycerin vermischt und nach kräftigem „Vortexen“ bei -80°C eingefroren.

Die nachfolgende Maxipräparation zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit dem „Maxiprep-Kit“ (Qiagen) vorgenommen. Sie sollte dazu dienen, Plasmid-DNA in größerer Menge und hoher Qualität zu gewinnen, was für eine effiziente Transfektion notwendig ist.

Die 250 ml Lösung der Übernacht-Kultur wurde am nächsten Tag in Zentrifugenkolben überführt und für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert (GSA-Rotor, 4000 Upm; Sorvall® RC 28S). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entsprechend dem mitgelieferten Protokoll weiterbehandelt.

Am Ende wurde die gewonnene Plasmid-DNA in 1 ml H₂O bid. aufgenommen.

Wie nach der Minipräparation wurde von der gewonnenen Plasmid-DNA die Konzentration UV-spektrophotometrisch bestimmt und ein Restriktionsverdau (Gesamtvolumen 10 µl: 1 µl Plasmid-DNA; 1 µl Puffer; 0,5 µl Enzym; 7,5 µl H₂O) mit anschließender Elektrophorese angesetzt (siehe Abs. 1.2.3 - 1.2.4).

Ein Polaroidfoto mit dem erbrachten Nachweis der cDNA-Fragmente der Connexine sowie der Puromycin-Klone wurde erstellt.

1.2.6 Isolierung von cDNA aus Agarosegelen

Zur Gewinnung von cDNA, die als Sonde für die „Northern Blot“-Analyse (siehe Abs.1.3.1) eingesetzt wurde, wurde von der durch die Maxipräparation erhaltenen Plasmid-DNA, welche die Connexine 26, 40 und 43 enthielt, erneut ein Restriktionsverdau mit anschließender

Elektrophorese angesetzt. Ein entsprechendes Volumen von 12 µg Plasmid-DNA, 2 µl Puffer und 1 µl Restriktionsenzym wurde in H₂O bidest zu einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgenommen und 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA durch Elektrophorese (wie unter Abs. 1.2.4 geschildert). Als Agarosegel wurde Gold Agarose (FMC) verwendet, da diese Agarose weniger Verunreinigungen enthält.

Nach erfolgter Auftrennung wurden unter UV-Licht-Kontrolle die sichtbaren Banden der Cx-cDNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten.

Zur Isolierung von DNA aus der Agarose wurde ein PCR-Reaktionsgefäß mit einer Kanüle am Boden durchbohrt und mit Kunststoffwatte gefüllt, auf welche das ausgeschnittene Gelstück plazierte wurde. Dieses PCR-Röhrchen wurde nun in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gelegt und anschließend 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert.

Durch diesen Versuchsaufbau konnte die cDNA im 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen werden, während die Agarose in der Watte zurückblieb.

Zur Kontrolle der Isolierung sowie zur Abschätzung der Konzentration wurde mit einem Aliquot von 5 µl der gewonnenen cDNA eine erneute Elektrophorese durchgeführt.

Die Konzentration wurde durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen der Marker-banden des mitgelaufenen DNA-Molecular-Weight-Marker III (0,12 - 21,2 kb) abgeschätzt.

1.3 RNA

1.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA für die „Northern Blot“-Analyse wurde die „RNA-Clean TM-Method“ (AGS) angewendet.

Zu Beginn der RNA-Extraktion wurde 1 ml des mitgelieferten RNA-Clean-Puffer auf die Zellen einer zu ca. 70% konfluenten Schräghals-Kulturflasche (25 cm²; Falcon) gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber (Cell Scraper; TRP 9902) homogenisiert, nachdem zuvor das Medium abgesaugt und die Zellen mit Moskona-Lsg. (s. Anhang) gewaschen worden waren. Die homogenisierten Zellen wurden dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 100 µl Chloroform für 15 s kräftig geschüttelt und auf Eis gestellt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden die Reaktionsgefäße 15 min bei 12000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert.

Das Homogenat bildete danach drei Schichten: Eine untere gelbliche Phenol-Chloroform enthaltene Schicht, eine mittlere organische Schicht, welche mit DNA und Proteinen versehen war und eine obere farblose wäßrige Phase, in der die RNA gelöst war.

Als nächstes wurde die obere wäßrige Schicht unter dem Abzug vorsichtig in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und zur Präzipitation der RNA das gleiche Volumen an Isopropanol zugeführt. Nach Mischung und 15-minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Proben für 15 min bei 12000 Upm (4°C) abzentrifugiert. Nach Abschluß der Zentrifugation konnte das RNA-Präzipitat als weißliches Pellet beobachtet werden. Es folgten zwei

Waschschritte mit 70%igem Ethanol. Der Überstand wurde verworfen und zum RNA-Pellet 1 ml 70% Ethanol gegeben, gevortext und die Probe schließlich bei 7500 Upm (4°C) für 8 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet unter Vakuum im Exsikator 5 min getrocknet und in 20 µl RNase freiem H₂O bidest gelöst. Zur besseren Auflösung wurde eine Inkubation bei 60°C für 10 min durchgeführt.

Der RNA-Gehalt wurde photometrisch in Quarzküvetten bestimmt und die Exstinktion der Proben bei 260 nm und 280 nm (995 µl H₂O bid. + 5 µl RNA) gegen die Referenzprobe (1 ml H₂O bid.) gemessen. Der Reinheitsgrad wurde mit dem Quotienten E260/E280 kontrolliert und die Konzentration in [µg/µl] berechnet.

1.3.2 Fällung von RNA

Zur Vorbereitung auf die Gelelektrophorese wurde die RNA am Vortag in der gewünschten Menge und Konzentration gefällt (3µl Probe sollte ca. 5 µg RNA enthalten).

Zur Fällung der RNA wurde dem Volumen RNA, welches ca. 5 µg RNA entsprach, 1/10 Vol 3 M NaAcetat-Lsg. (pH 5,2) und 2 Vol 100%iger Ethanol in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zugeführt. Die Mischung wurde gevortext und ü.N. bei -20°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben 10 min bei 14000 Upm zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation das Pellet im Exsikator unter Vakuum 5 min getrocknet. Anschließend wurde das RNA-Pellet in 3 µl Volumen H₂O bidest aufgenommen.

1.3.3 Auftrennung von RNA durch Gelelektrophorese

Der Gelaufbau zur Auftrennung der RNA unterscheidet sich von dem für DNA-Agarosegele in der Hinsicht, daß RNA zur Vermeidung von Sekundärstrukturen in denaturierenden Agarosegelen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargröße elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Dazu wurde ein 1,6%iges Agarosegel verwendet, das zur Denaturierung von Sekundärstrukturen in der RNA 2,2 M Formaldehyd enthielt. Als Laufpuffer diente MOPS-Puffer (s. Anhang).

Die 3 µl Proben, die nach Fällung 5 µg RNA enthielten, wurden mit Formamid (50% Vol./Vol.) und ebenfalls Formaldehyd (2,2 M) versetzt und durch Erhitzen bei 55°C im Wasserbad für 15 min denaturiert. Anschließend wurde 1,5 µl RNA-Laufpuffer und 1,5 µl Ethidiumbromid zugegeben und die Proben in die Geltaschen aufgetragen.

Als Positivkontrollen wurden RNA von Ratten-Leberzellen (für Cx26) und Ratten-Herzzellen (für Cx40 und Cx43) verwendet.

Es wurde eine Spannung von 90 V angelegt und die Elektrophorese für 1-2 h durchgeführt.

Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel auf der UV-Bank begutachtet und zusammen mit einem angelegten Lineal zur späteren Lokalisierung der Banden photographiert.

1.3.4 „Northern Blot“-Analyse von RNA

1.3.4.1 Kapillarblot

Zum Nachweis spezifischer Transkripte durch Hybridisierung mit radioaktiv-markierten cDNA-Sonden mußte die RNA zunächst aus dem Agarosegel auf eine Membran übertragen werden. Dieser Transfer von RNA auf eine Nylonmembran (HybondTM N; Amersham; Life Science) wurde durch Kapillarkräfte unter Verwendung von 20x SSC (s. Anhang) gewährleistet.

Kapillartechnik und Blotaufbau entsprach der Beschreibung von Sambrook et al., 1989. Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran dauerte etwa 16-20 h.

Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran zur Fixierung der RNA bei 80°C für 2 h gebacken. Der erfolgte Transfer konnte durch abschließende Begutachtung des Gels unter UV-Licht kontrolliert werden.

1.3.4.2 Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung der cDNA-Sonden (Gewinnung s. Abs.1.2.6) für die Hybridisierung wurde das „Multiprime DNA labelling system“ (Amersham, Braunschweig) eingesetzt. Dieses System beruht auf der Methode von Feinberg und Vogelstein, 1983.

Mit Hexanukleotid-Primern, welche zufällig an die DNA binden, wurde unter Einsatz der DNA-Polymerase I neue DNA von der Matrix synthetisiert, wobei durch Zugabe von α -³²P-dCTP im Reaktionsansatz auch radioaktiv markierte Nukleotide eingesetzt wurden.

25 ng cDNA wurden nach den Angaben des Herstellers mit α -³²P-dCTP (10µCi/µl, 3000 Ci/mmol, ICN, Meckenheim) radioaktiv markiert.

Nachdem freie, nicht inkorporierte Nukleotide über eine Sephadex G-50-Säule abgefangen wurden, stand nun die radioaktiv markierte cDNA zur Hybridisierung zur Verfügung. Die Proben wurden zur Denaturierung noch im Wasserbad 5 min gekocht und danach direkt auf Eis gestellt, bevor sie für die Hybridisierung verwendet wurden.

1.3.4.3 Hybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nylonmembran zunächst durch Zugabe von 10 ml Vorhybridisierungslösung (s. Anhang) in einen verschließbaren Kunststoffmeßzylinder mindestens 3 h bei 42°C vorhybridisiert.

Anschließend wurde die radioaktiv-markierte cDNA-Sonde zugeführt und der Meßzylinder zur Hybridisierung ü.N. bei 42°C in einem Hybridisierungssofen (Typ 400 HY, Backofer GmbH, Reutlingen) gehalten.

Um unspezifisch gebundene Sonde vom Blot zu entfernen, wurde nach Abschluß der Hybridisierung der Blot bei 65°C mit Lösungen abnehmender Salzkonzentration und damit steigender Stringenz gewaschen.

Das Waschen erfolgte zuerst für 15 min in 2x SSC/1% SDS, dann für 1 h in 1x SSC/0,1% SDS und zuletzt für 30 min in 0,5x SSC/0,1% SDS.

Zur Darstellung der Hybridisierungssignale erfolgte eine Autoradiographie durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Kodak, X-OMAT AR) auf den Blot und eine Exposition mit Verstärkerfolie bei -80°C.

Je nach Signalstärke wurde der Röntgenfilm nach 1-14 Tagen entwickelt.

Um den Blot einer erneuten Hybridisierung unterziehen zu können, wurde die alte Sonde durch Zugabe von kochendem H₂O und Schütteln bei 80°C für die Dauer von 1 h von der Membran entfernt.

Zur Überprüfung, ob die einzelnen Spuren des Blots die gleiche Menge an RNA enthielten, wurden alle Blots mit β -Aktin rehybridisiert.

Nun war ein semiquantitativer Nachweis von mRNA möglich.

2. Zellen und Zellkultur

2.1 Zelllinie

Bewo: Diese humane Chorionkarzinomzelllinie wurde von der American Type Culture Collection CATCC (Rockville, Maryland, USA) bezogen.

Die maligne Trophoblastzelllinie wurde 1966 als erste menschliche hormonproduzierende, permanent wachsende Zelllinie etabliert (Pattilo und Gey, 1968).

Als Ausgangsmaterial diente ein Chorionkarzinom der fötalen Plazenta. Die Zellen wurden zunächst in Hamsterbackentaschen transplantiert und über einen Zeitraum von acht Jahren 304 mal transferiert (Hertz, 1995).

2.2 Kultivierung von Zellen

2.2.1 Allgemeines und Kulturmedium

Die Zelllinie wurde bei 37°C und 5% CO₂ / 95% O₂ in einem befeuchteten Begasungsbrutschrank (Nuaire) kultiviert. Als Kultivierungsgefäße dienten 10 cm Petrischalen oder Schräghals-Kulturflaschen mit 25 cm² und 75 cm² Wachstumsfläche (Falcon).

Als Kulturmedium wurde verwendet:

HAM's F12 ohne Glutamin; 17% FCS; 0,17% Glutamin; Pen/Strep

Das Medium wurde dreimal pro Woche mit einer Pasteurpipette aus den Kulturflaschen abgesaugt und je nach Größe der Flaschen 5 - 10 ml frisches bei 37°C im Wasserbad aufgewärmtes Medium zugeführt.

Die Beobachtung der Kulturen erfolgte mit einem inversen Mikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung (Wild Leitz).

Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Monolayer mit Moskona-Lsg. (s. Anhang) gewaschen. Nach erneutem Absaugen wurden die Zellen durch Zufuhr von 1-2 ml einer 0,05%igen Trypsin / 0,02%igen EDTA-Lösung und anschließender zehnminütiger Inkubation bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst. Sie wurden dann in 5 bzw. 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in unterschiedlicher Verdünnung in neue Kulturflaschen überführt.

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch durch Membranfilter (Porengröße 0,2 µm; VacuCap 60; Gelman Sciences) sterilisiert. Metall- und Glasgegenstände wurden durch Heißluft in einem Wärmeschrank bei 180°C 8 Stunden lang sterilisiert, Kunststoffteile sowie Agarlösungen durch Wasserdampf (120°C; 1,3 bar) autoklaviert.

Sämtliche an den Zellkulturen ausgeführten Arbeiten wurden auf einer zuvor desinfizierten (UV-Licht; 70% Ethanol) Arbeitsplatte einer Sterilarbeitsbank (Nuaire) durchgeführt.

2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Ein konfluent Monolayer wurde, wie unter 2.2.1 beschrieben, trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und in sterile Zentrifugenröhrchen (50 ml PP-Röhrchen; Greiner) überführt. Anschließend wurde für 10 min in einer Heraeus Labofuge M zentrifugiert (800 Upm), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 2 ml frischem Medium resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt. Diesem wurde 100 µl (5%) DMSO (s. Anhang) zugegeben und das Gefäß nach drei- bis viermaligem Umschwenken sofort auf Eis gestellt.

Die Zellen wurden dann für einen Tag zunächst bei -80°C in der Gefriertruhe gelagert und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen der Zellen sollte schnell erfolgen, da das zugesetzte DMSO zytotoxisch ist. Das Kryogefäß wird direkt aus dem flüssigen Stickstoff genommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Der aufgetaute Inhalt wird in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, in dem sich 30 ml vorgewärmtes Kulturmedium befindet. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 800 Upm für 10 min.

Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein Kulturgefäß zur weiteren Kultivierung gegeben.

2.4 Stabile Transfektion von Zellen mit Plasmid DNA

Das Einbringen und Exprimieren von Plasmid-DNA erfolgte durch die Liposomen-Technik mit dem LipofectAmine-Reagent (Life Technologies, Gibco).

Zu beachten ist, daß es sich im folgenden um eine Co-Transfektion zweier Plasmidvektoren handelt (Cx-Expressionvektor bzw. Leervektor + Puromycin-Selektionsvektor). Hierbei ist das Resistenz vermittelnde Gen nicht auf dem gleichen Vektor wie die Cx-Expressionseinheit lokalisiert.

Folgende Ansätze zur Transfektion wurden vorbereitet (bezogen auf 10 cm Petrischalen):

1) Plasmid-DNA:

ca. 11 µg	(Cx-Expressionsvektor bzw. Leervektor + Puromycin-Selektionsvektor im Verhältnis 2:1)
+ Opti MEM	(Transfektionsmedium, welches kein FCS enthält; Gibco)

Σ 800 µl	

2) LipofectAmine:

50 µl
+ 750 µl Opti MEM

800 µl

3) Opti MEM: 6,4 ml

Der Plasmid-DNA-Ansatz und der LipofectAmine-Ansatz wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß an der Sterilarbeitsbank zusammenpipettiert und dieses für 25 min bei RT inkubiert.

Während dieser Zeit konnten sich DNA-Liposomen-Komplexe bilden. Die mizellenartigen Fettemulsionen sind positiv geladen und verbinden sich mit der negativ geladenen DNA zu einem membrangängigen Komplex.

Danach wurde das 1,6 ml Gemisch in ein 10 ml Röhrchen überführt, welches 6,4 ml Opti MEM enthielt, so daß insgesamt 8 ml Transfektionsansatz zur Verfügung standen.

Die BeWo-Zellen wurden in einer 10 cm Petrischale kultiviert, bis ein Konfluenzgrad von etwa 70% erreicht wurde. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit Moskona-Lsg. gewaschen. Dann wurde der Transfektionsansatz zu der Monolayer gegeben und die Zellen für 6 h im 37°C Brutschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz abgesaugt, die Zellen mit Moskona gewaschen und neues Kulturmedium zugeführt.

Am dritten Tag nach der Transfektion wurde mit der Selektion auf Resistenz begonnen.

Die Resistenz wurde durch einen Vektor (pBEH-pac18) vermittelt, der ein Puromycin-Resistenzgen enthielt (pac-Gen). Dieses sog. „pac-Gen“ kodiert ein Enzym, die Puromycin-N-acetyltransferase, welches durch eine Acetylierungsreaktion das einwirkende Puromycin inaktiviert.

Für die Selektion war eine stufenweise Erhöhung der Puromycin-Konzentration notwendig, wobei mit einer Konzentration von 350 ng/ml begonnen wurde. Die Dosierung reichte gerade aus, um die als Kontrolle dienenden parental BeWo-Zellen absterben zu lassen. Dies wurde in einer Konzentrationsreihe an parental BeWo-Zellen zuvor ermittelt.

Nach fünf Tagen Kultivierung wurde der Selektionsdruck auf 500 ng/ml gesteigert und nach weiteren fünf Tagen schließlich die Endkonzentration von 750 ng/ml zugeführt.

Dabei wurde in einem Zeitraum von etwa drei Wochen das Absterben von Zellen und die Formation von Zellhaufen beobachtet. Diese charakteristische, klonale Zellhaufenbildung wurde dokumentiert (Photoautomat Wild MPS 46/52).

Nachdem sich schließlich deutliche Zellaggregate (mind. 100 Zellen) herausgebildet haben, begann die Selektion dieser Zellklone durch Aufsetzen von Borosilicatglasklonierungszyklindern (Hilgenberg).

Das Medium in den Petrischalen wurde abgesaugt und die Zellhaufen mit Moskona-Lsg. gewaschen. Anschließend wurden einzelne Zellhaufen ausgewählt und diese mit den Borosilicatglasklonierungszyklindern bestückt, deren unterer Rand zur Abdichtung mit dem Boden in Fett getaucht worden war. In die Zylinder wurden dann 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung pipettiert und die Zellklone für 10 min im Brutschrank inkubiert.

Mit einer Gilsonpipette wurden anschließend die Zellen durch Resuspendieren vom Boden eines jeden Zylinders abgelöst und in eine entsprechende Kammer einer 24-Well-Kulturplatte (Falcon) überführt. Diese enthielten ca. 2 ml frisches Medium mit der entsprechenden Selektionslösung von 750 ng/ml Puromycin.

In den darauf folgenden Tagen der Kultivierung konnte auf diese Weise in einigen Kammern das Anwachsen von resistenten Zellklonen beobachtet werden. Diese stabil transfizierten Zellen standen nun für die nähere Charakterisierung mittels Immunhistochemie zur Verfügung.

3. Immunhistochemie

Zur Identifizierung von Connexin-Proteinen an der Zellmembran der transfizierten BeWo-Klone sowie zum Nachweis ihrer entsprechenden Puromycin-Klone wurde die Methode der indirekten Immunhistochemie angewendet (Winterhager et al.;1993).

Diejenigen Kammern in der 24-Well-Kulturplatte, die unter dem gewählten Selektionsdruck ein konfluentes Wachstum von BeWo-Klonen zeigten, wurden trypsinisiert und jeweils in entsprechende Kammern zweier 12-Well-Kulturplatten (Falcon) transferiert. Eine der beiden Platten enthielt jeweils ein Deckgläschen in den Kammern, welches, nachdem sich auf diesem

ein entsprechender Monolayer gebildet hatte, für die Immunhistochemie ein bis zwei Tage später zur Verfügung stand.

Die Zellen auf den Deckgläschen wurden zunächst 5 min mit PBS (s. Anhang) gewaschen. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Fixierung der Zellen durch ein 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch. Nach abermaliger PBS-Waschung (10 min) schloß sich in mehrfachen 5-10 minütigen Inkubationsschritten eine Waschung mit einer 0,5% BSA/PBS-Lösung (s. Anhang) zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen an.

Jetzt waren die Zellen für die Zugabe des Primärantikörpers vorbereitet.

Folgende Primärantikörper gegen die verschiedenen Connexine wurden in einer Verdünnung von 1:50 verwendet:

- 1) Anti Cx26, polyklonales affinitätsgereinigtes Antiserum aus Kaninchen (Traub et al., 1989)
- 2) Anti Cx40, polyklonales, affinitätsgereinigtes Antiserum aus Kaninchen gegen den C-Terminus des Moleküls (Traub et al., 1994)
- 3) Anti Cx43, polyklonales, affinitätsgereinigtes Antiserum aus Kaninchen gegen den C-Terminus des Moleküls (Traub et al., 1992)

Die Inkubation des Primärantikörpers wurde für 90 min bei RT angesetzt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Antikörper auf den Deckgläschen in mehreren Waschschritten mit der BSA/PBS-Lösung ausgespült (1x 10 min, 2x 5 min auf dem Schüttler).

Es folgte die Zugabe des Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:40.

Folgender Sekundärantikörper wurde verwendet:

Anti-Kaninchen-IgG, FITC-konjugiert, polyklonales Antiserum vom Schwein (Dako, Code No. F205, Lot 113)

Da der Sekundärantikörper zur späteren Detektion mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist (FITC = Fluoreszein Isothiocyanat Isomer), wurden während der 45-minütigen Inkubation und bei den nachfolgenden Waschschritten die Schalen in Alufolie verschlossen, um die Fluoreszenzmarkierung vor Licht zu schützen.

Nach erneuten Auswaschungsschritten auf dem Schüttler, wurden die Deckgläschen kurz in H₂O bid. getaucht und auf Objektträgern mit einem käuflichen Eindeckmedium für die Immunfluoreszenz (Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence; H-1000; Vector) fixiert.

Die Immunfluoreszenz konnte nun durch ein Photomikroskop mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung (Axiophot; Firma Zeiss) ausgewertet werden.

Die Anregung der FITC-Fluoreszenz erfolgte mit der Filterkombination λ 530-585, FT 600, LP 61500.

Als positiver spezifischer Nachweis von Gap-junction Connexinen wurden distinkte Fluoreszenzpunkte an den Zellgrenzen gewertet (perlschnurartige Plaqueformationen). Mit Hilfe von Phasenkontrastumschaltung gelang es, eine bessere morphologische Zuordnung der Fluoreszenz herzustellen und ggf. cytoplasmatische Lokalisationen aufzuzeigen. Die Ergebnisse wurden durch Photoaufnahmen (Neopan 1600 ASA; Fuji) dokumentiert. Je nach Fluoreszenzintensität wurde eine Belichtungszeit von 20-50 s gewählt. Es wurde je eine Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme angefertigt.

Die Transfektanten mit der stärksten und homogensten Expression des Connexins und ihre entsprechend charakterisierten Negativkontrollen - die Puromycin-Klone, welche nur den Basisvektor ohne Cx-Insert und den Puromycin-Selektionsvektor enthielten - wurden aus den entsprechenden 12-Well-Kulturplatten in 25 cm² Schrāghals-Kulturflaschen überführt, weiterkultiviert und bei entsprechendem Bestand ein Anteil des Klons eingefroren (s. Abs. 2.3).

Die in Kultur gehaltenen Transfektanten standen nun für die weitere Charakterisierung mittels Immunhistochemie und Northern Blot sowie für die Proliferationsstudie zur Verfügung.

4. Proliferationsrate

Um den Einfluß der exogen exprimierten Connexine auf das Proliferationsverhalten der Chorionkarzinomzellen zu testen, wurde zunächst folgende Versuchsreihe vorbereitet:

Je drei verschiedene Transfektanten eines Connexins wurden mit entsprechenden Puromycin-Klonen (Basisvektor ohne Insert + Puromycin-Selektionsvektor) als Negativkontrolle und der parental BeWo-Zelllinie in getrennten Ansätzen im Wachstum verglichen.

Die Messung der Zellzahl erfolgte mit einem Zellzählgerät (Casy®1 Cell Counter + Analyser System Modell TT; Schärfe System GmbH), welches neben Zellzahl auch die Zellgröße ermitteln konnte.

Zur Vorbereitung einer Zellzahlbestimmung am Zählgerät wurde eine zu ca. 70% konfluente Schrāghalskulturflasche (25 cm²) trypsinisiert, mit 10 ml Medium resuspendiert und die entsprechende Menge in ein steriles Becherglas überführt. Für die Messung wurde ein Meßbecher mit 10 ml einer für das Gerät spezifischen Meßlösung aufgefüllt (Casy® ton; isotone Salzlösung zur Verdünnung von Zellproben; gebrauchsfertig für Arbeit mit Cellcounter).

Entsprechend einer gewählten Verdünnung von 1:200 (Zellen/Casy-Lsg.), die am Gerät zuvor als Berechnungsgrundlage eingestellt wurde, wurden 50 µl resuspendierte Zellen aus dem Becherglas in die Meßbecher pipettiert.

Die Zellzahl konnte auf einem LCD-Display als Mittelwert zweier Messungen als absolute Zahl der in einer bestimmten Größenverteilung gezählten Partikel und rückgerechnet als Zahl

pro ml Flüssigkeit abgelesen werden (Partikelkonzentration, die sich aufgrund der Partikelzahl, des Verdünnungsfaktors und des Außenvolumens ergibt).

Da für die Proliferationsstudie 10000 Zellen ausgesät werden sollten, konnte nun die entsprechende Menge Zellösung errechnet werden, welche 10000 Zellen enthielten.

Die errechnete Menge mit etwa 10000 Zellen wurde danach in 12-Well-Kulturplatten (Falcon) ausgesät.

Um statistische Fehler zu vermeiden, ist es wichtig, daß die Zellen sowohl vor dem Transfer in die Meßbecher oder in die Kammern der Kulturplatten als auch in den Meßbechern vor jeder Messung mit dem Counter durch Auf- und Abpipettieren oder Schütteln immer resuspendiert vorliegen.

Die Proliferation wurde über einen Zeitraum von zehn Tagen verfolgt und das Medium (2ml pro Kammer) alle 2 Tage gewechselt. Am 2., 4., 6., 8. und 10. Tag wurde eine Messung der Zellzahl durchgeführt. An jedem der fünf Zähltag wurden zur Ermittlung von Mittelwert und Standardabweichung je drei Kontrollproben eines Connexins, des Puromycin-Klons und der parentalen BeWo-Zelllinie ausgezählt.

Folgende Schritte wurden an jedem Zähltag durchlaufen:

Das Medium der zu zählenden Kammer wurde zur β -hCG-Bestimmung abgenommen (s.Abs. 5.), die Kammern mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lsg. 10 min im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde die Kammer mit 0,5 ml Medium zu einem Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt, resuspendiert und 50 μ l in einen mit 10 ml Casy-Lsg. gefüllten Meßbecher überführt (Vorgabeverdünnung 1:200). In diesem wurde nun über das Zellzählgerät unter den genannten Vorgaben die Zellzahl pro ml Volumen errechnet. Die Angaben wurden auf vorgefertigten Protokollbögen notiert, der Mittelwert und die Standardabweichung aus den drei Kontrollproben berechnet und auf diese Weise eine Proliferationskurve für Connexin, Puromycin-Klon und parentale BeWo-Zelllinie erstellt.

Im weiteren Verlauf wurde eine zweite Proliferationsreihe durchgeführt, bei der neben den drei Transfektanten eines Connexins und der parentalen BeWo-Zelllinie nur noch einer der jeweiligen Puromycin-Klone zur Proliferation zu einem gemeinsamen Zeitpunkt ausgesät wurde.

Zudem wurden die Zähltag auf den 4., 7. und 10. Tag beschränkt.

5. β -hCG-Bestimmung

Chorionkarzinome produzieren wie Trophoblasten β -hCG (humanes Choriongonadotropin). Die β -hCG-Hormonproduktion kann als Differenzierungsparameter herangezogen werden (Pierce und Midgley, 1963; Kliman et al., 1986; Kohler et al., 1971).

An jedem Zähltag wurde das Medium der zu zählenden Kammer zu je 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäßen überführt und bis zur Laborbestimmung bei -80°C verwahrt.

Die β -hCG-Analyse der entnommenen Medienproben wurde im Labor der Abteilung für Gynäkologie am Klinikum Essen durchgeführt.

Zum Vergleich der quantitativen Hormonproduktion bei Connexinen, Puromycin-Klonen und der BeWo-Zelllinie wurden 1 ml Proben der jeweils am 10. Tag entnommenen Medien eingeschickt und das Ergebnis als milli-International Units pro 2 ml pro Zelle und pro 24 h graphisch als Säulendiagramm dargestellt.

Die Bestimmung der β -hCG-Konzentration erfolgte mit dem Clinical AssaysTM Gamma Dab® M [¹²⁵I] β -hCG Radioimmunoassay Kit (Incstar Corporation - Stillwater, Minnesota, USA, Katalog-Nr. CA-1511). Es handelt sich um einen immunradiometrischen Assay (IRMA), in dem das gesamte hCG-Molekül sowie die freien hCG- β -Untereinheiten durch ¹²⁵I-markierte Antikörper erkannt werden. Der Meßbereich reichte von 5 - 200 mU/ml (3. Internationaler Standard 75/537).

6. Nacktmäuse

Um das Proliferations- und Invasionsverhalten Cx-transfizierter BeWo-Zellklone mit parental BeWo-Zellen nicht nur *in-vitro*, sondern auch *in-vivo* zu vergleichen, wurden die Zellen subkutan in Nacktmäuse (NMRI, nu/nu, Anzucht im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen) injiziert.

Die in der Studie verwendeten Mäuse waren alle männlichen Geschlechts und zu Versuchsbeginn 10-12 Wochen alt. Es wurden jeweils drei Tiere in Käfigen mit Filterhaube bei 22°C RT und 55% rel. Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Einstreu wurde Weichholzfaser verwendet. Nacktmäusefutter und Wasser stand jederzeit zur freien Verfügung. Ein Luftwechsel fand 10 mal pro Stunde statt, der Hell-Dunkel-Zyklus betrug 12 Stunden (Lichtwechsel 12:12 h).

Nacktmäuse sind durch die fehlende Anlage des Thymus immunsupprimiert, so daß sich exogen eingebrachte Tumorzellen, die subkutan in eine Gewebstasche der Flanken beidseits injiziert werden, in ihrem Wachstum beobachten lassen.

Es standen je drei Nacktmäuse für die Applikation eines Klons der drei Connexine und der parental BeWo-Zelllinie zur Verfügung. Es sollten jeweils 10⁶ Zellen beidseits subkutan in die Flanke injiziert werden.

Mit einem Casy®1 Cell Counter (siehe Abs.4) wurde die Zellsuspensionsmenge für 10⁶ Zellen berechnet, diese in 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit Medium aufgefüllt und bei 800 Upm 10 min zentrifugiert (Heraeus Labofuge M). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 250 μ l Medium resuspendiert und schließlich mit einer Insulinspritze (1 ml Einmalspritze, Braun) aufgenommen.

Der Inhalt von 250 μ l Medium mit 10⁶ Zellen der Einmalspritze wurde nun in die Flanken der Nacktmaus injiziert und die Nacktmaus regelmäßig auf eine Tumorentwicklung hin beobachtet und abgetastet.

7. Anhang

7.1 Karten der Vektoren

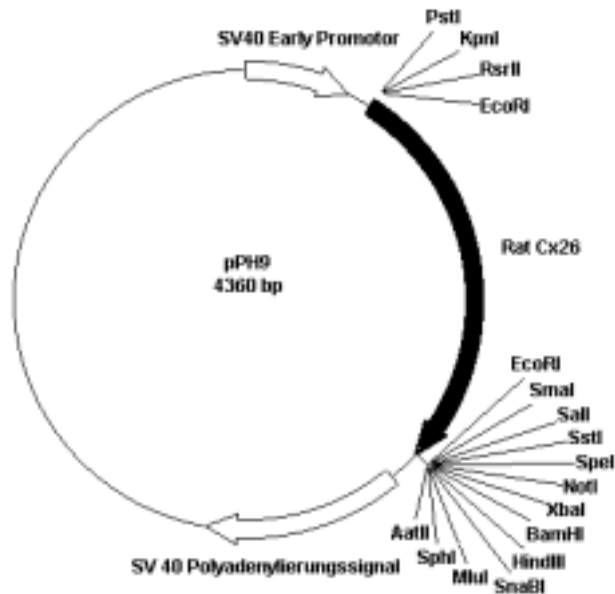


Abb. 1: Cx26-Expressionsvektor (Größe: 4,36 kb)

Basisvektor: pSV.SPORT1 (Größe: 3,16 kb; Referenz: GibcoBRL)

Insert: 1,2 kb großes EcoRI cDNA-Fragment des Ratten Cx26 Gens (Referenz: Hellmann, 1995)

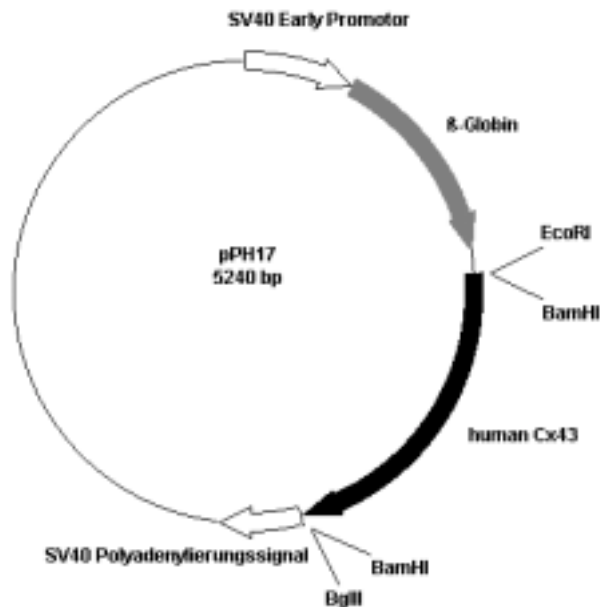


Abb. 2: Cx43-Expressionsvektor (Größe: 5,24 kb)

Basisvektor: pSG-5 (Größe: 4,1 kb; Referenz: Stratagene)

Insert: 1,14 kb großes BamHI cDNA-Fragment des humanen Cx43 Gens (Referenz: Hellmann, 1995)

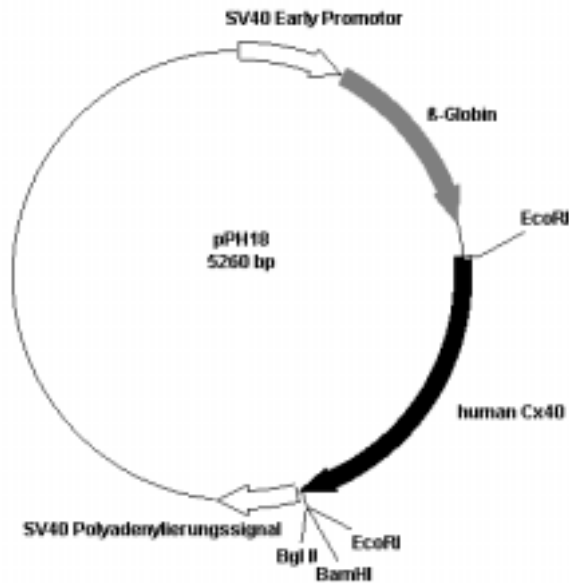


Abb. 3: Cx40-Expressionsvektor (Größe: 5,26 kb)
 Basisvektor: pSG-5 (Größe: 4,1 kb; Referenz: Stratagene)
 Insert: 1,16 kb großes EcoRI cDNA-Fragment des humanen Cx40-Gens (Referenz: Hellmann, 1995)

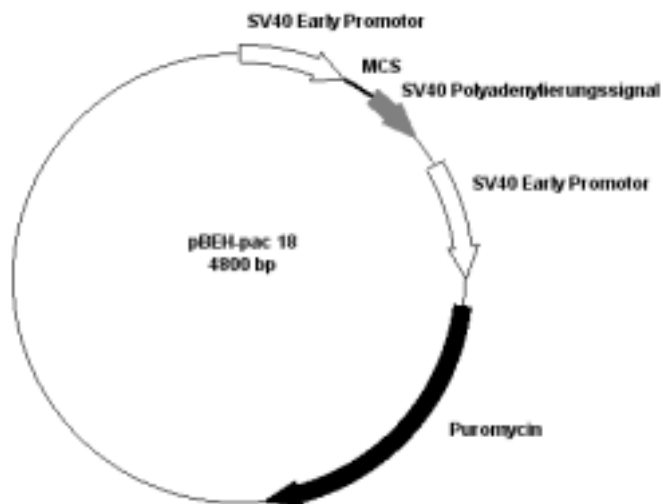


Abb. 4: Puromycin-Selektionsvektor (Größe: 4,8 kb)
 Der Vektor enthält ein etwa 1 kb großes Puromycin-Resistenzgen (pac-Gen = Puromycin-N-acetyltransferase-Gen) (Referenz: Willecke, 1994)

7.2 Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Kulturmedien

<u>LB-Medium:</u>	Komplettmedium Laura-Bertani (LB), welches zur Anzucht von Bakterien verwendet wurde (Sambrook et al., 1989); 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto Yeast-Extract, 10 g NaCl, ad 1 l H ₂ O
<u>Agarplatten:</u>	1 l LB-Medium, 15 g Agar, Ampicillin 0,1 mg/ml; Das LB-Medium wurde mit 1,5% Agar versetzt und 20 min autoklaviert (120°C; 1,7 bar). Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden ca. 10 ml in 10 cm Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten bei 4°C gelagert. Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde kurz vor dem Gießen der Agarplatten Ampicillin (0,1 mg/ml) zugeführt.
<u>GTE-Lösung (Lösung I):</u>	50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM TrisCl pH 8,0, 1 mg/ml RNase A, 1 Spatelspitze Lysozym
<u>Lösung II:</u>	0,2 N NaOH, 1% SDS
<u>Lösung III:</u>	3 M NaAcetat, pH 5,2
<u>TAE-Puffer:</u>	0,04 M Tris-Acetat, 1 mM EDTA
<u>MOPS-Puffer:</u>	4,2 % w/v Morpholinopropansulfonsäure, 2 M Na-Acetat (pH8,5), 0,5 M EDTA (pH 7,5), pH 7,0 einstellen
<u>20 x SSC:</u>	3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,0
<u>Vorhybridisierungs-Hybridisierungslösung:</u>	10 % Dextransulfat, 50 % deionisiertes Formamid, 0,8 % SDS, 1 M NaCl, 100 µg/ml Heringssperma-DNA
<u>PBS:</u>	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
<u>Moskona-Lösung:</u>	0,8 % NaCl, 0,2 % Glukose, 0,1 % NaHCO ₃ , 0,03 % KCL, 0,005 Na ₂ HPO ₄ , 0,0025 % KH ₂ PO ₄
<u>DNA-Ladepuffer (6 x):</u>	0,25 % w/v Bromphenolblau, 0,25 % w/v Xylencyanol, 15 w/v Ficoll Typ 400
<u>RNA-Ladepuffer:</u>	50 % Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF

7.3 Liste der Chemikalien

7.3.1 Molekularbiologie

von Boehringer:	DNA Längenstandard III, Heringssperma-DNA
von Pharmacia:	Sephadex G-50
von Promega:	dTTP, dCTP, dATP, dGTP
von Fluka:	Na-Dodecylsulfat (SDS)

von Sigma:	Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA), Lysozym, Agarose, MOPS, Ficoll Typ 400, Dextransulfat, Formamid
von Serva:	Bromphenolblau, Xylencyanol FF, Ethidiumbromid, Ampicillin
von Merck:	NaCl, NaOH, NaHCO ₃ , Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , Na- Citrat, Na-Acetat, Agar-Agar, Glycerin, Methanol, Ethanol, Chloroform, Aceton, Isopropanol, Glukose

7.3.2 Zellkultur

Ham's F 12 (10 mg/l Phenol Red, 1,176 g/l NaHCO ₃):	Biochrom, Nr. F 0815)
Penicillin (50000 IU/ml), Streptomycin (50 mg/ml):	Boehringer, Nr. 1074440
L-Glutamin, 200 mM:	Gibco, Nr. 25030-024
Fötales Kälberserum (FCS):	Gibco, Nr. 10106-078
Trypsin/EDTA-Lösung (2,5 %):	Gibco, Nr. 25090-028
Puromycin:	Sigma, Nr. P 7255
Dimethylsulfoxid (DMSO):	Merck, Nr. 2950
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ⁺ :	Seromed, Nr. L 182-50
Albumin Bovine (BSA):	Sigma, Nr. A 8022
Lipofect Amine:	Gibco Nr. 18324-012
Opti MEM 1:	Gibco Nr. 51985-026

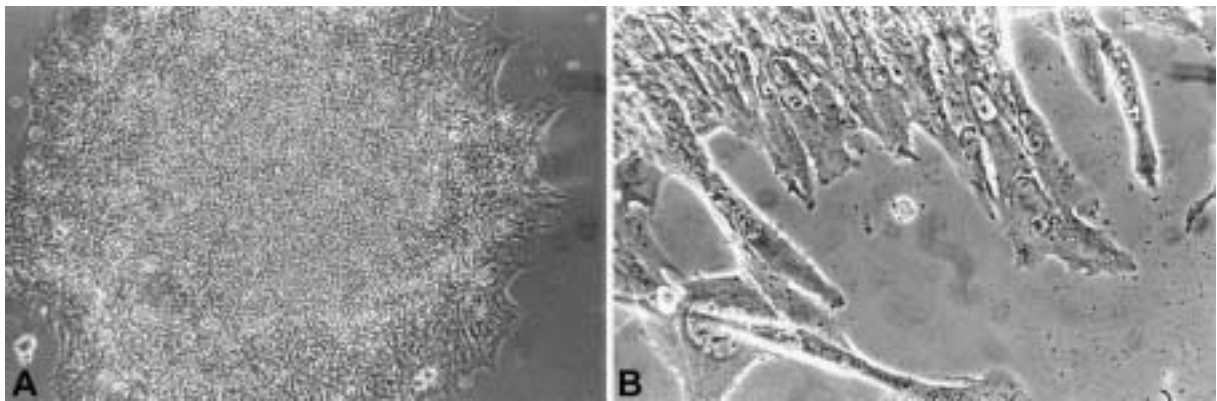
C. Ergebnisse

1. Selektion von Transfektanten und immunhistochemische Untersuchungen

Nach der Co-Transfektion der BeWo-Zellen, bei welcher ein Cx-Expressionsvektor mit der cDNA von Cx26, Cx40 und Cx43 sowie ein Puromycin-Selektionsvektor mit dem Puromycin-N-Acetyltransferase-(pac-)Resistenzgen mittels Liposomen-Technik in die Zellen eingebracht worden waren, wurden Puromycin-resistente Transfektanten (Abb.1) auf ihr Vorhandensein von Connexin-Proteinen immunhistochemisch untersucht.

Für die BeWo-Zelllinie wurden jeweils 30-40 resistente Transfektanten, die mit den Connexinen 26, 40 und 43 stabil transfiziert wurden und in den Kammern der Kulturplatten einen homogenen Zellrasen ausbildeten, für die Immunhistochemie isoliert und entsprechend charakterisiert.

Abb. 1: BeWo-Zellklon nach Transfektion in Kultur



Die Abbildung zeigt die Bildung klonaler Zellaggregate nach Transfektion (A) und die randständigen, typischen klonalen Zellausläufer (B) am Beispiel eines Cx26-Klons 18 Tage nach Transfektion (A: 6,3-fache Vergrößerung; B: 20-fache Vergrößerung).

Der Nachweis dieser verschiedenen Gap-junction-Untereinheiten an der Zellmembran erfolgte mit spezifischen Antikörpern, die gegen den intrazellulären C-Terminus des Moleküls gerichtet waren. Die Bindungsspezifität dieser Primärantikörper wurde von Traub et al., (1994), bereits charakterisiert und die Ergebnisse publiziert, so daß umfangreiche Kontrollen entfallen konnten.

Die immunhistochemische Untersuchung stellte nicht nur den Erfolg der stabilen Transfektion sicher, sondern diente auch der Charakterisierung der verschiedenen Transfektanten bezüglich der Homogenität, Art und Morphologie der exogenen Cx-Expression. Auch ein Vergleich zur endogenen Cx40-Expression der BeWo-Zellen war möglich.

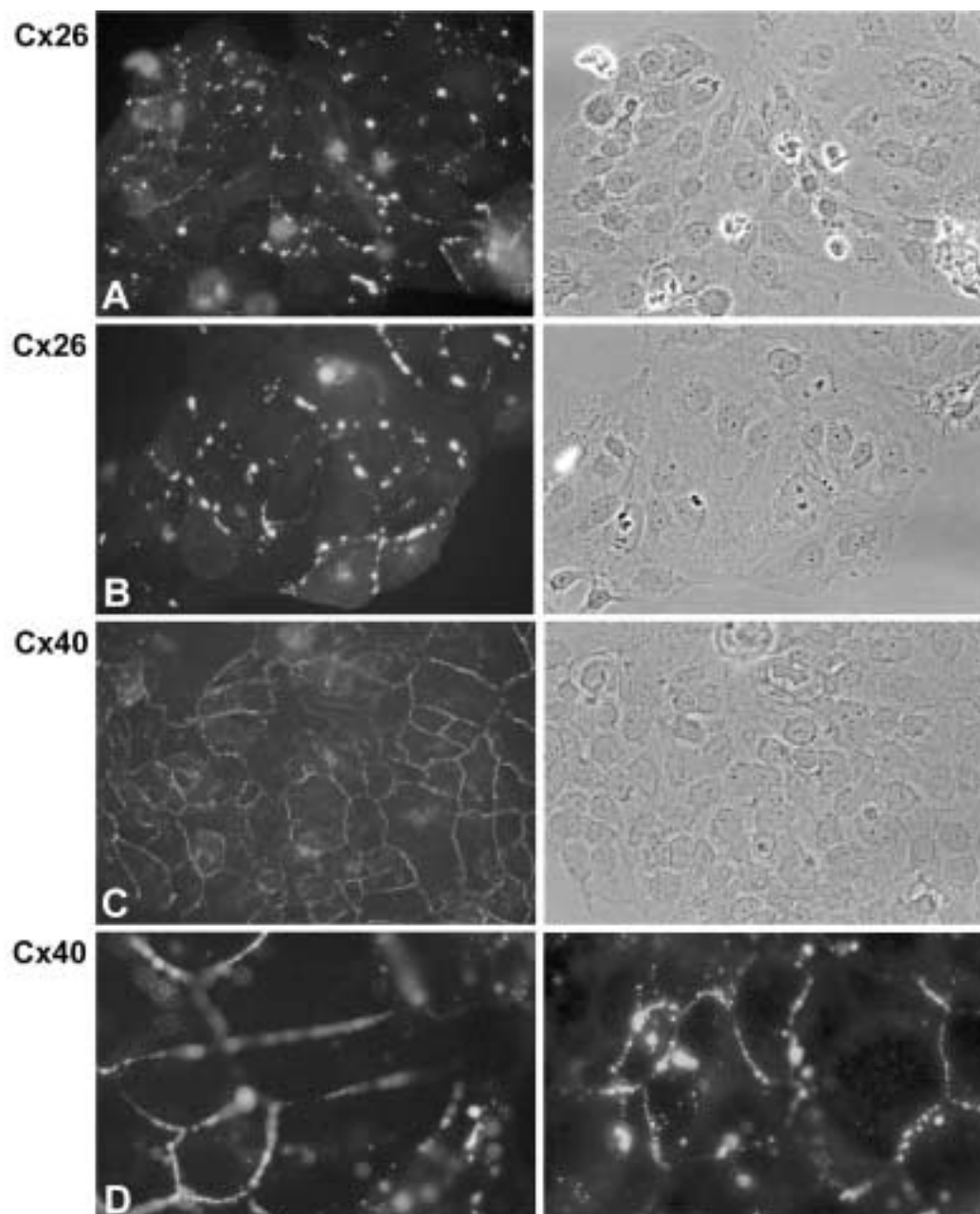
Gap-junction-Kanäle sind nicht einzeln und homogen über die Zellmembran verteilt, sondern bilden sogenannte „Plaques“ (Hellmann et al., 1995). Diese Aggregate erscheinen in der Immunfluoreszenz als punktförmige Gebilde.

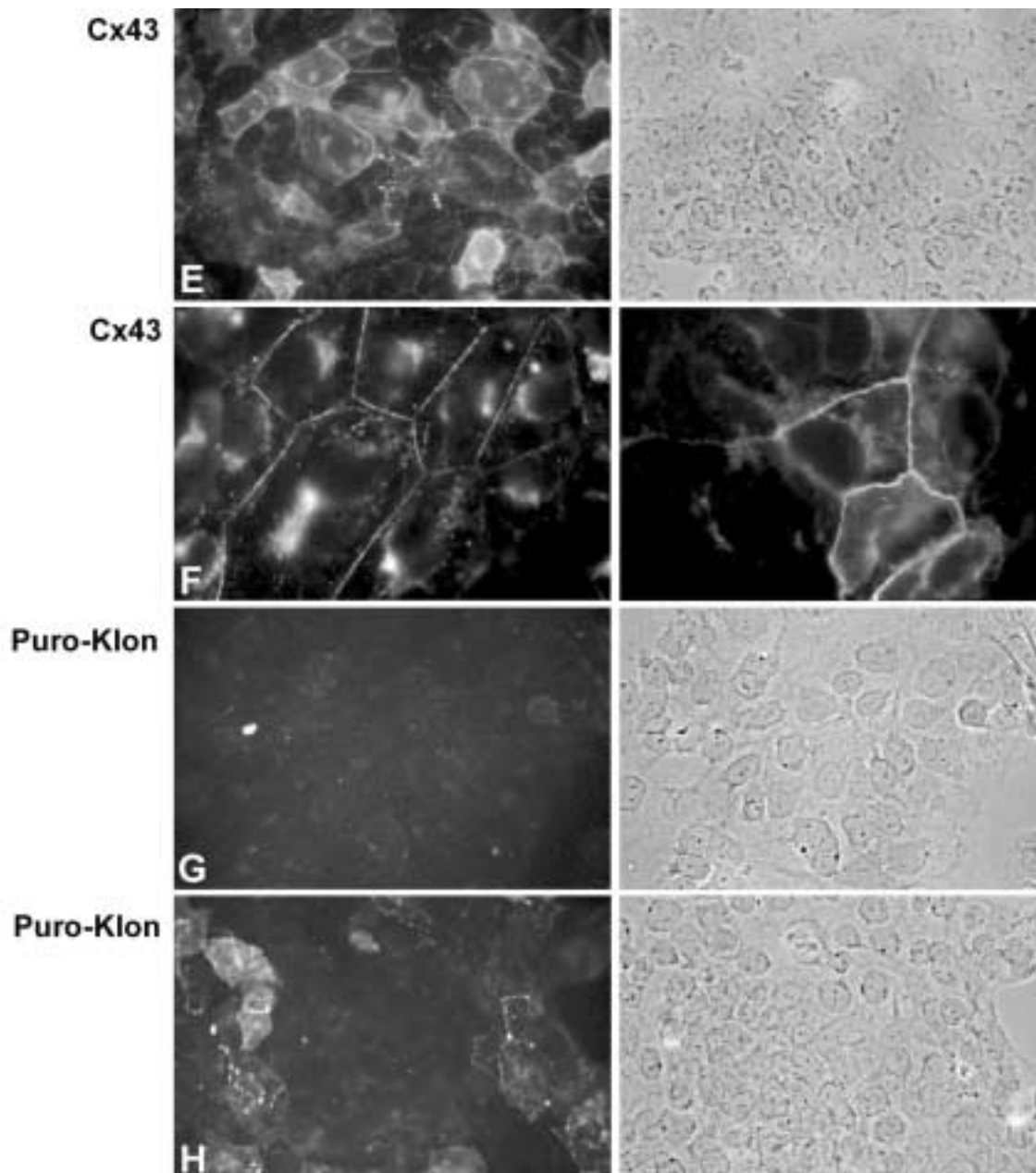
In meinen Untersuchungen lagen diese distinkten Punkte in mehreren Varianten vor: Sie reichten von einer inhomogenen Streuung von Plaque-Formationen über eine perlschnurartige Aneinanderreihung bis hin zu homogen verteilten Expressionsmustern entlang der Membranen (Abb.2).

Als Negativkontrolle wurden die mit ihren entsprechenden Leervektor transfizierten Zellen verwendet. Diese im folgenden als „Puromycin-Klone“ bezeichnete Zellpopulation bestand aus dem Basisvektor ohne Cx-Insert und dem Puromycin-Selektionsvektor.

Etwa zehn Transfektanten eines Connexins mit hoher und homogener Expression wurden in Kultur gehalten. Die drei besten etablierten Transfektanten eines Connexins wurden schließlich für die Proliferationsbestimmung eingesetzt.

Abb. 2: Immunhistochemischer Nachweis von Cx26 (A,B), Cx40 (C,D) und Cx43 (E,F) in transfizierten BeWo-Zellen.





Fluoreszenzaufnahme (links) und zugehörige Phasenkontrastaufnahme (rechts). Auf den Fluoreszenzaufnahmen erkennt man positive Signale an den Zellgrenzen der transfizierten BeWo-Zellen, nicht dagegen an den Zellgrenzen der Puromycin-Klone mit dem transfizierten Leervektor pSG-5 (G: Untersuchung auf Cx43 als Negativkontrolle). Ausnahme: Der auf Cx40 untersuchte Puromycin-Klon (H) zeigt eine inhomogene Cx40-Expression, welche der endogenen Cx40 Expression der BeWo-Zellen entspricht.

Vergrößerung: 40 x (A,C,E,G,H); 100 x / Öl (B,D,F).

1.1 Stabile Transfektion von BeWo-Zellen mit Cx26:

Von 33 immunhistochemisch untersuchten Transfektanten zeigten zehn Transfektanten die typische Plaque-Formation der Gap-junctions als perlschnurartige Gebilde (Abb. 2 A, B). Teilweise sind sehr kräftige Plaque-Formationen erkennbar. Ferner fallen auch zytoplasmatische Lokalisationen von Cx-Proteinen mit Fluoreszenz als intrazelluläre Vesikel auf

(Abb. 2 B). Dies ist ein Zeichen dafür, daß der Klon hinsichtlich der Proteinbiosynthese zur Cx-Expression sehr aktiv ist.

Die übrigen Transfektanten zeigten nur eine heterogene oder keine Expression.

Der entsprechende Puromycin-Klon mit dem transfizierten Leervektor pSV.SPORT wurde ebenfalls auf Cx26 untersucht. Wie erwartet konnte keine Expression nachgewiesen werden.

1.2 Stabile Transfektion von BeWo-Zellen mit Cx40:

Von 26 Transfektanten, die immunhistochemisch untersucht wurden, zeigten zehn Transfektanten eine gute und homogene Expression.

Neben einer perlschnurartigen Immunreaktion fiel in den meisten Fällen auch ein homogen verteiltes Expressionsmuster entlang der Membranen auf (Abb. 2 C).

Die immunhistochemische Färbung dieser homogenen Zellpopulation unterschied sich von solcher mit schwacher, inhomogener, endogener Cx40-Expression bzw. von den Puromycin-Klonen, die mit dem Leervektor pSG-5 transfiziert wurden (Abb. 2 H).

In Abb. 2 D sind ebenfalls deutlich zytoplasmatische Lokalisationen von Cx-Proteinen in der Immunfluoreszenz zu erkennen.

1.3 Stabile Transfektion von BeWo-Zellen mit Cx43:

Von 43 Transfektanten zeigten 11 immunhistochemisch untersuchte Transfektanten ein kräftiges, homogenes Expressionsmuster an den Membranen.

Vereinzelt war auch eine punktförmige Immunreaktion von Gap-junctions erkennbar (Abb. 2 E).

Die entsprechend auf Cx43 getesteten Puromycin-Klone mit dem transfizierten Leervektor pSG-5 zeigten keine Expression (Abb. 2 G).

Zusammenfassung:

1. Rund ein Drittel der Puromycin-resistenten Transfektanten, die auf das Vorhandensein von Connexin-Proteinen mittels Immunhistochemie analysiert wurden, zeigten eine hohe und homogene Connexin-Expression. Die Ausbeute an etablierten Transfektanten mit hoher und homogener Expression ließ sich nach Reduktion des Selektionsdruckes verbessern. In Vorversuchen an Cx26-Transfektanten zeigte sich, daß diese bei einem Selektionsdruck von 1,0 mg/ml Puromycin in Kultur degenerative Plaques bildeten und sich schließlich auflösten. Passagieren führte vielfach zu vermindertem Anwachsen und schließlich zum Absterben der Zellen (Abb. 3).

Die Senkung der Puromycinkonzentration von 1,0 auf 0,75 mg/ml führte nicht nur dazu, daß rund ein Drittel aller stabil transfizierten Transfektanten eine hohe und

homogene Cx-Expressionsrate aufwies, sondern auch dazu, daß die potentiell toxischen Einflüsse des Puromycins zunächst keine Auswirkungen auf die Kultivierung zeigten.

Die Puromycin-Konzentration im Kulturmedium wurde entsprechend bekannter Literaturquellen so gewählt, daß zur Selektion auf Resistenz nach Transfektion mit einer Dosis begonnen wird, die gerade ausreicht, die als Kontrolle dienenden parentalen BeWo-Zellen absterben zu lassen und schrittweise auf eine Endkonzentration gesteigert wird, welche die parentalen BeWo-Zellen deutlich absterben läßt.

2. Das immunhistochemische Bild der Gap-junction-Expression variierte hinsichtlich der Morphologie unter den drei Connexintypen.

Während bei Cx26 die typische Plaquebildung mit perlschnurartigen Punktformationen vorherrschend war, kam bei Cx40 ein homogenes, lineares Muster hinzu. Dieses Muster entlang der Membranen war bei den Cx43-Transfektanten vorherrschend.

Die Untersuchung der Puromycin-Klone mit dem transfizierten Leervektor pSG-5 auf Cx 40 bestätigte die bekannte, inhomogene endogene Cx40-Expression der BeWo-Zelllinie.

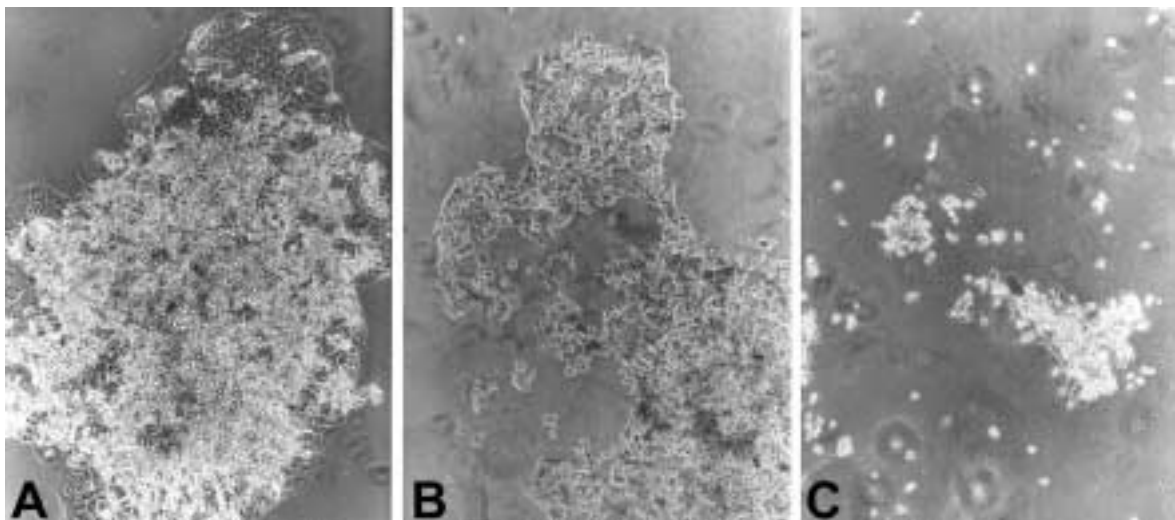
Abb. 3: Typischer degenerativer Verlauf eines Cx26-transfizierten Klons während der Kultivierung bei einer Puromycin-Konzentration von 1,0 mg/ml.

A: Die Abbildung zeigt, wie sich die Zellen nach etwa 3 Wochen Kulturdauer zu einem Plaque organisiert haben, welcher v. a. zentral zur Degeneration neigt.

B: Im Zuge der Degeneration beginnt der Plaque sich aufzulösen.

C: Zustand nach Trypsinisierung der Plaques. Ein Anwachsen eines homogen verteilten Zellrasens blieb aus. Nur noch einzelne absterbende Zellen sind sichtbar.

Vergrößerung: 6,3 x



2. Proliferationsverhalten von verschiedenen BeWo-Connexin-Transfektanten im Vergleich zu den Puromycin-Klonen mit transfiziertem Leervektor und den parentalen BeWo-Zellen

2.1 Erster Versuchsansatz zur Ermittlung der Proliferationsrate

Der Einfluß der exogenen Connexin-Expression auf das Proliferationsverhalten der stabil transfizierten BeWo-Zellen wurde an zwei bis drei Transfektanten eines Connexins überprüft, die nach immunhistochemischen Untersuchungen mit einer hohen und homogenen Connexinexpression ausgewählt worden waren.

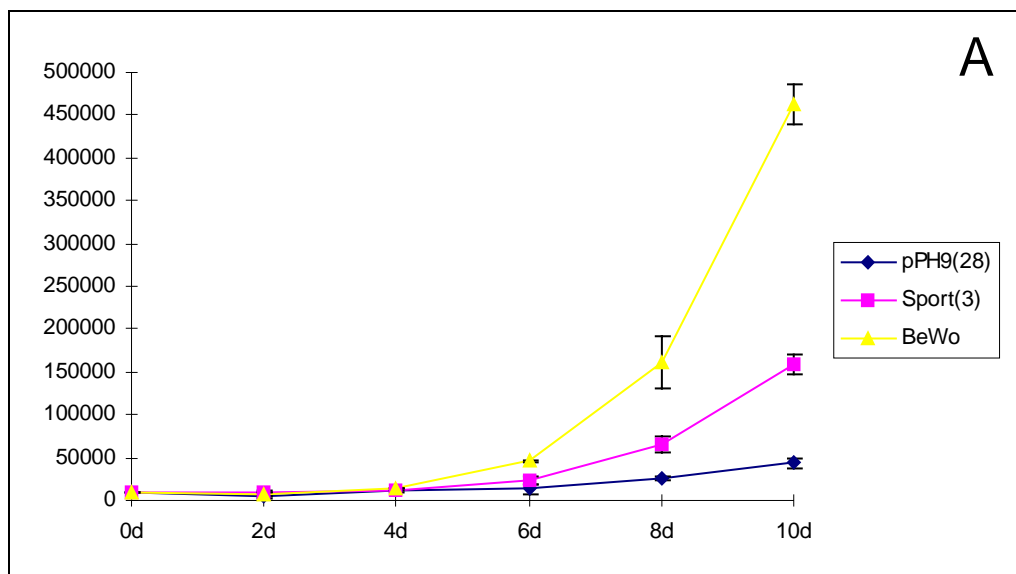
Um das Proliferationsverhalten zu untersuchen, wurden in einer ersten Versuchsreihe 10000 Zellen der jeweiligen Connexin-Transfektanten, 10000 Zellen der jeweiligen Puromycin-Klone mit entsprechendem Leervektor und 10000 parentale BeWo-Zellen ausplattiert und über einen Zeitraum von 10 Tagen kultiviert. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden alle zwei Tage die Zellzahl bestimmt und graphisch gegen die Zeit aufgetragen.

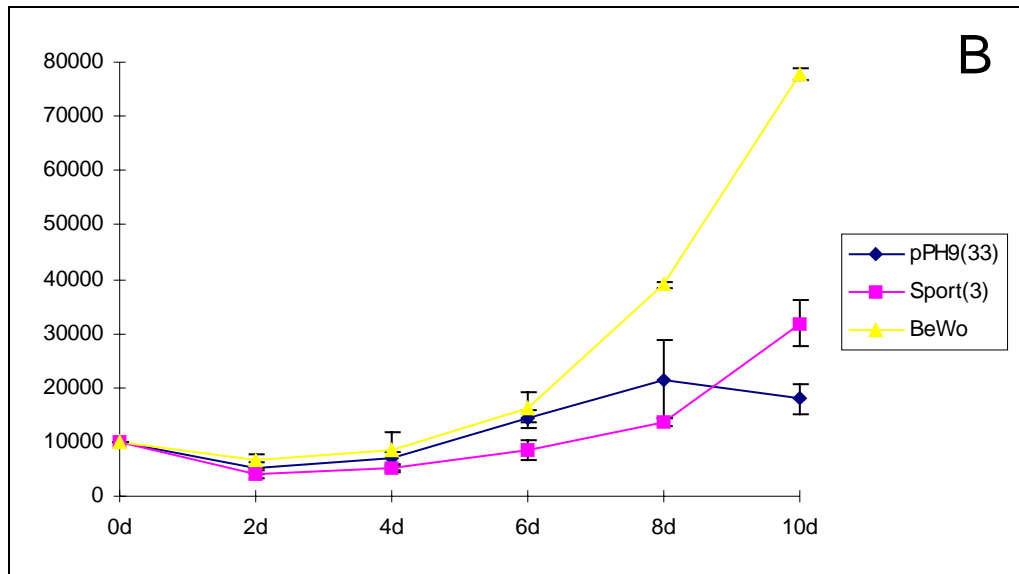
In den folgenden Diagrammen ist die Zellzahl gegen die Zeit in Tagen (d = days) aufgetragen.

2.1.1 Proliferationskurven der Cx26-Transfektanten

Abb. 4: Proliferationskurven zweier Cx26-Transfektanten (A: pPH9(28); B: pPH9(33)), des Puro-Klons mit transfiziertem Leervektor Sport(3) und der parentalen BeWo-Zellen.

Im Vergleich zu den BeWo-Zellen zeigt sich eine deutlich reduzierte Proliferation für Cx26-Transfektanten.

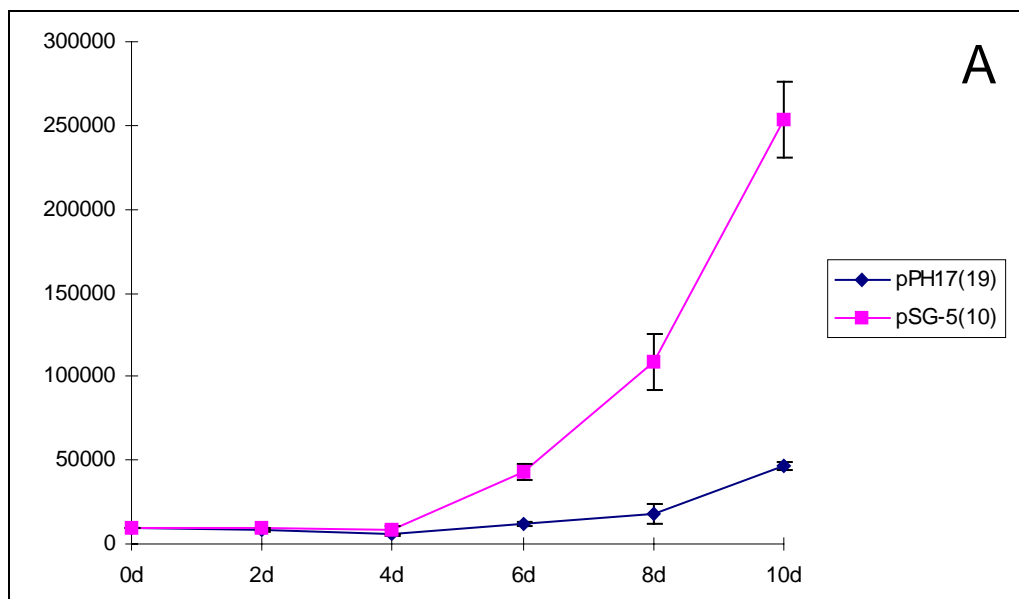


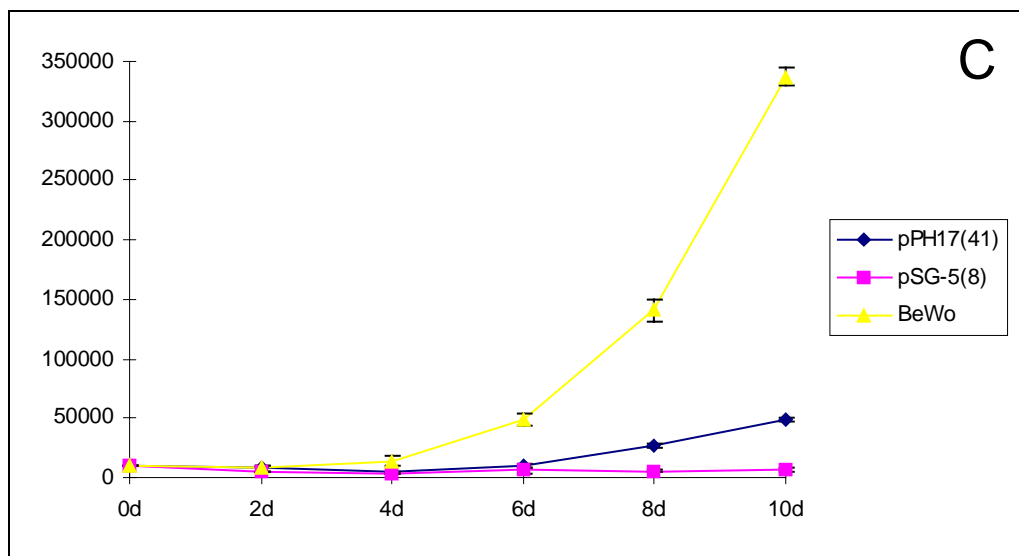
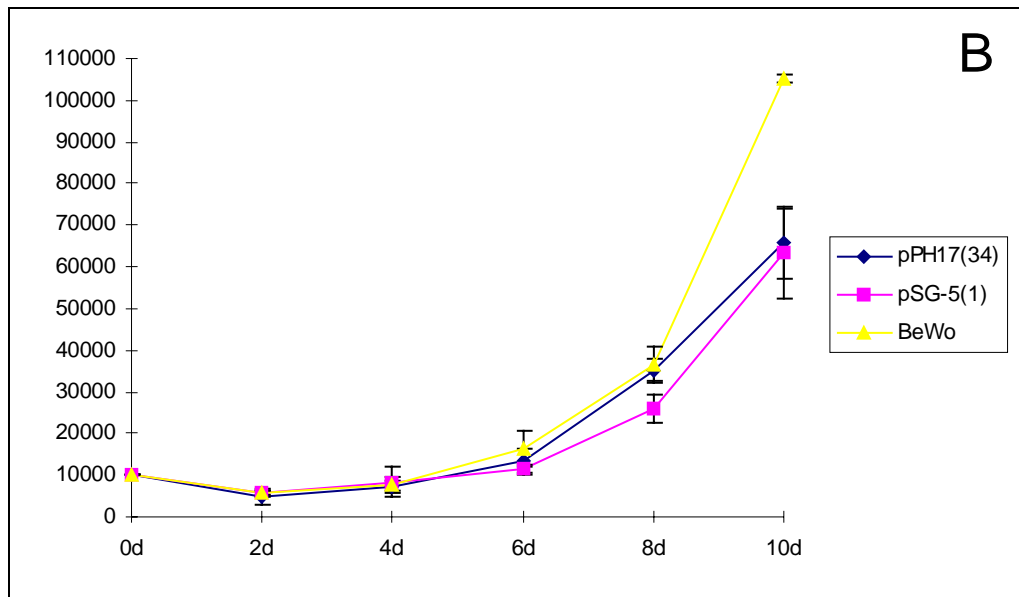


Die Cx26-Klone pPH9(28) und pPH9(33) zeigten einen deutlichen Proliferationsverlust gegenüber den parental BeWo-Zellen. Auch die Teilungsaktivität der Puromycin-Klone, mit dem Leervektor Sport(3) transfiziert, war geringer als die BeWo-Zellen und ist vergleichbar mit der der Cx26-Transfektanten.

2.1.2 Proliferationskurven der Cx43-Transfektanten

Abb. 5: Proliferationskurven dreier Cx43-Transfektanten (A: pPH17(19); B: pPH17(34); C: pPH17(41)), der Puromycin-Klone mit dem Leervektor pSG-5 und der parental BeWo-Zellen. Im Vergleich zu den BeWo-Zellen zeigt sich eine deutlich reduzierte Proliferation für Cx43-Transfektanten.

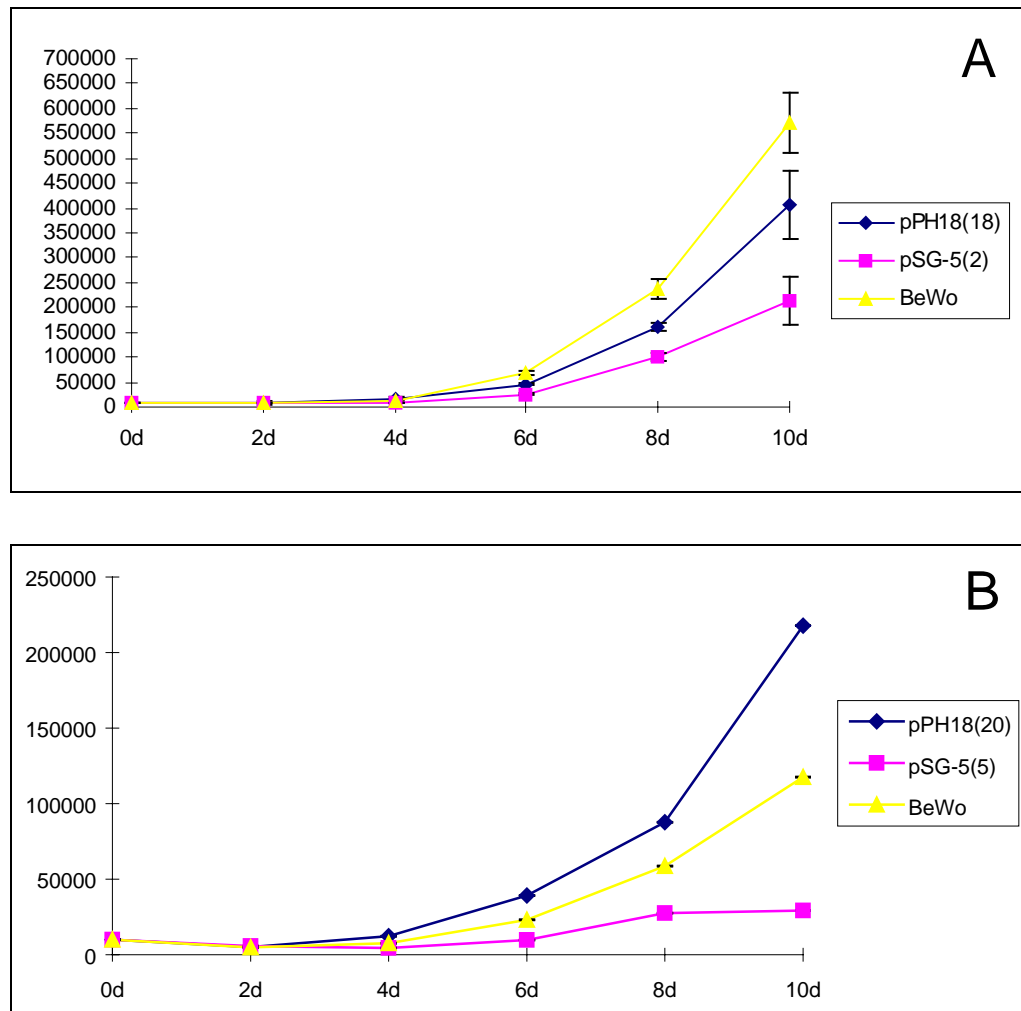




Die Cx43-Transfektanten pPH17(19), (34) und (41) waren ebenfalls in ihrer Proliferation gegenüber den parental BeWo-Zellen deutlich gehemmt. Die Puromycin-Klone mit den transfizierten Leervektoren verhielten sich in der Proliferation dagegen eher heterogen, insgesamt aber zeigten sie ebenfalls eine geringe Teilungsaktivität.

2.1.3 Proliferationskurven der Cx40-Transfektanten

Abb. 6: Proliferationskurven zweier Cx40-Transfektanten (A: pPH18(18); B: pPH18(20)), der Puromycin-Klone mit dem Leervektor pSG-5 und der parental BeWo-Zellen. Im Gegensatz zu den Cx26- und Cx43-Transfektanten zeigt sich eine hohe Proliferationsaktivität bei Cx40-Transfektanten.



Die Zellen der Cx40-Transfektanten pPH18(18) und pPH18(20) wiesen im Gegensatz zu den Cx26- und Cx43-Transfektanten eine hohe Proliferationsrate auf. Die Teilungsaktivität des Cx40-Klons pPH18(20) überstieg sogar die der parental BeWo-Zelllinie.

Die Puro-Klone mit den Leervektoren pSG-5(2) und pSG-5(5) proliferierten eher schwach und zeigten auch hier einen heterogenen Kurvenverlauf.

Zusammenfassung des ersten Versuchsansatzes:

An allen Kurven ließ sich zeigen, daß die Zellzahl nach Aussaat von 10000 Zellen sowohl bei den verschiedenen Cx-Transfektanten und Puro-Klonen als auch bei der parental BeWo-

Zelllinie zunächst absank und erst ab dem 6. Tag ein verstärktes Zellwachstum und damit eine Steigerung der Proliferation zu verzeichnen war.

Die Puro-Klone mit den transfizierten Leervektoren verhielten sich in ihrer Proliferation uneinheitlich. Mal lagen sie in ihrer Proliferation über den Cx-Transfektanten, mal darunter. Insgesamt waren sie aber proliferationsschwach und erreichten nicht die Proliferationsstärke der parentalen BeWo-Zellen.

Vergleicht man das Proliferationsverhalten der Cx-Transfektanten mit den parentalen BeWo-Zellen, so bewirkte Cx26 und Cx43 eine deutliche Abnahme der Proliferation, während Cx40-Expression eher einen Proliferationsanstieg nach sich zog.

2.2 Wiederholter Versuchsansatz zur Ermittlung der Proliferationsrate

Da im ersten Versuchsansatz zur Proliferationsbestimmung jeder einzelne Cx-Transfektant in zeitlich nicht identischen Ansätzen mit unterschiedlichen Puromycin-Klonen und einer jeweiligen parentalen BeWo-Kontrolle verglichen wurde, wurde zur besseren Standardisierung und zur Verifizierung der ersten Ergebnisse der Versuchsansatz mit denselben Cx-Transfektanten unter veränderten Bedingungen wiederholt. Hierbei wurden nur noch ein Puromycin-Klon mit dem entsprechend transfizierten Leervektor pSV.SPORT und pSG-5 und die parentale BeWo-Kontrolle mit allen Connexin-Transfektanten an einem Tag zur Proliferation ausgesät.

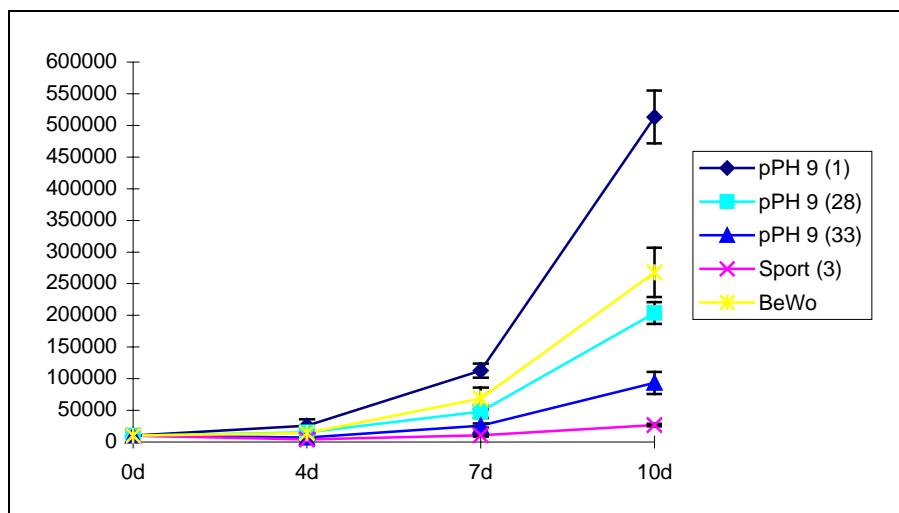
Zwischen dem ersten und dem Wiederholungsversuch lag ein Zeitraum von 5-7 Wochen.

In dieser wiederholten Versuchsreihe zeigten sich folgende Ergebnisse:

2.2.1 Proliferationskurven der Cx26-Transfektanten

Abb. 7: Proliferationskurven dreier Cx26-Transfektanten (pPH9(1), (28) und (33)), des Puromycin-Klons mit dem transfizierten Leervektor Sport(3) und der parentalen BeWo-Zellen.

Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe zeigten die Cx26-Transfektanten eine erhöhte Zellteilungsrate.



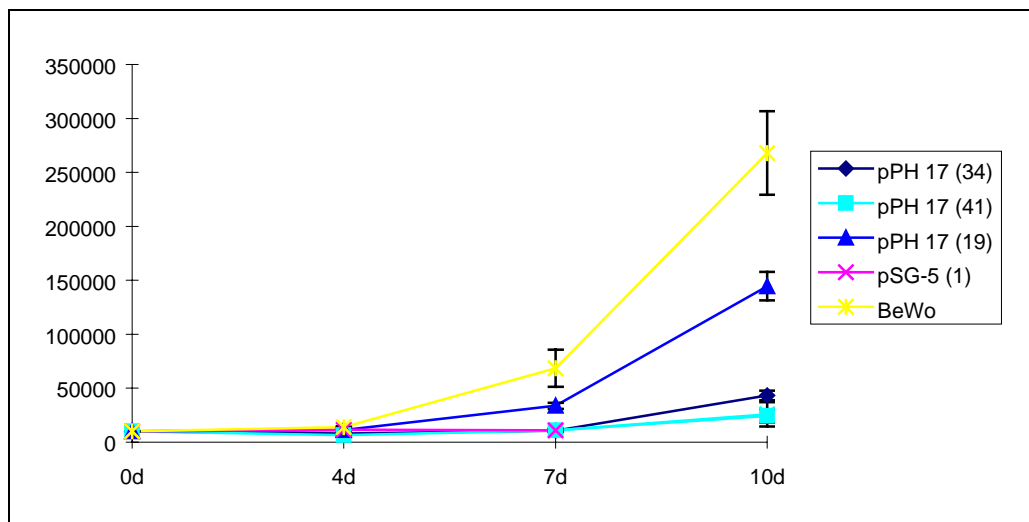
Die Cx26-Transfektanten zeigten gegenüber der ersten Proliferationsreihe eine erhöhte Proliferationsstärke. Der Klon pPH9(1) zeigte eine Proliferation, die über der der parental BeWo-Zellen lag. Auch der Klon pPH9(28), der in seiner Proliferation in der Nähe der parental BeWo-Zellen lag und der Klon pPH9(33) neigten im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe zu einer stärkeren Zellteilungsaktivität.

Wie unter Kapitel 2.3 weiter ausgeführt, zeigten immunhistochemische Untersuchungen an diesen Transfektanten einen Verlust von Cx26. Die Abbildung zeigt, daß nach immunhistochemisch festgestelltem Cx-Verlust, die Cx26-Transfektanten wieder eine erhöhte Proliferationsaktivität erlangen, die für Klon pPH9(1) sogar über der der parental BeWo-Zellen liegt.

2.2.2 Proliferationskurven der Cx43-Transfektanten

Abb. 8: Proliferationskurven dreier Cx43-Transfektanten (pPH17(34), (41) und (19)), des Puromycin-Klons pSG-5(1) und der parental BeWo-Zellen.

Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe zeigte der Klon pPH17(19) eine erhöhte Zellteilungsrate. Die anderen Cx-Transfektanten zeigten dagegen erneut eine reduzierte Proliferation im Vergleich zu den BeWo-Zellen.



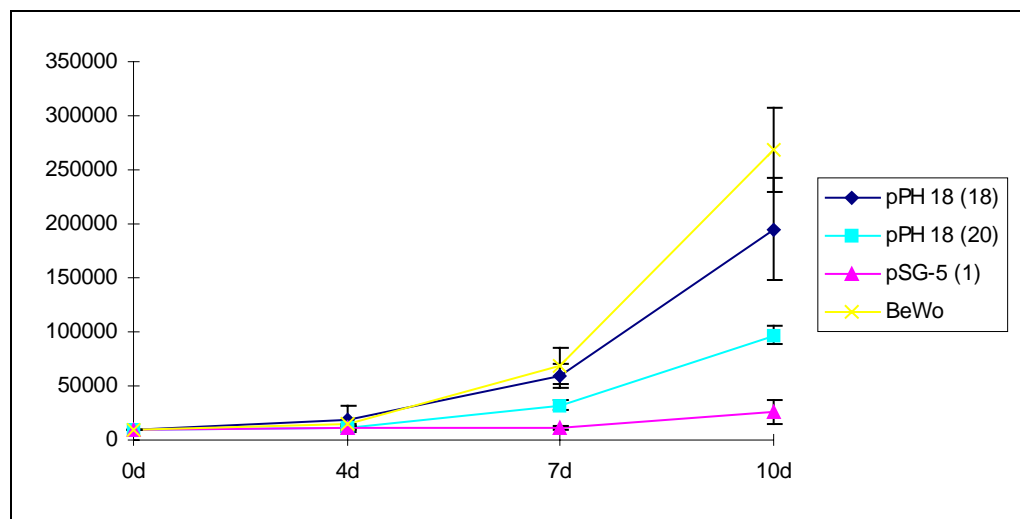
Die Zellteilungsrate der Cx43-Transfektanten variierte. Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe zeigte der Klon pPH17(19) einen Proliferationsschub, während die anderen beiden Klone pPH17(34) und pPH17(41) die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe, d.h. die einer verminderten Proliferationsaktivität, bestätigten.

Immunhistochemische Untersuchungen an diesen Transfektanten zeigten einen Verlust der Cx43-Expression für pPH17(19), während bei den anderen beiden Transfektanten weiter eine Cx43-Expression festzustellen war. Die Abbildung veranschaulicht, daß bei Erhalt der Cx-Expression (immunhistochemisch nachgewiesen bei Klon pPH17(34) und (41)) eine reduzierte Proliferationsaktivität bestehen bleibt, Cx-Verlust (immunhistochemisch nachgewiesen für Klon pPH17(19)) dagegen einen Proliferationsschub bewirkt.

2.2.3 Proliferationskurven der Cx40-Transfektanten

Abb. 9: Proliferationskurven zweier Cx40-Transfektanten (pPH18(18) und pPH18(20)), des Puromycin-Klons pSG-5(1) und der parental BeWo-Zellen.

Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe zeigten die Cx40-Transfektanten eine reduzierte Zellteilungsrate.



Auch die Cx40-Transfektanten zeigten gegenüber der ersten Versuchsreihe eine veränderte Teilungsaktivität.

Insbesondere der Klon pPH18(20), der in der ersten Versuchsreihe durch eine hohe Proliferationsrate gekennzeichnet war, zeigte nun einen markanten Proliferationsverlust. Ebenfalls ist anhand des Kurvenverlaufs eine Reduktion der Zellteilungsrate des Klons pPH18(18) erkennbar, die aber insgesamt über der von Klon pPH18(20) lag.

Die immunhistochemische Untersuchung ergab einen Cx-Expressionsverlust für beide Transfektanten. Im Gegensatz zu den Cx26- und Cx43-Transfektanten zeigt die Abbildung nach immunhistochemisch nachgewiesenem Cx-Verlust eine reduzierte Proliferationsaktivität für die Cx40-Transfektanten.

Die beiden Puromycin-Klone mit den Leervektoren pSG-5(1) und Sport(3) blieben wie in der ersten Versuchsreihe sehr proliferationsschwach.

Schlußfolgerung:

Diese unterschiedlichen, z.T. widersprüchlichen Ergebnisse der beiden Proliferationsuntersuchungen der Cx-Transfektanten ließen vermuten, daß die Transfektanten im späteren Wiederholungsversuch ein verändertes Connexinspektrum gegenüber der ersten Versuchsreihe aufwiesen.

Aus diesem Grunde wurden alle Transfektanten erneut immunhistochemisch untersucht. Außerdem wurde eine RNA-Analyse durchgeführt, um eine Veränderung der Connexin-Expression auf Transkriptionsebene auszuschließen.

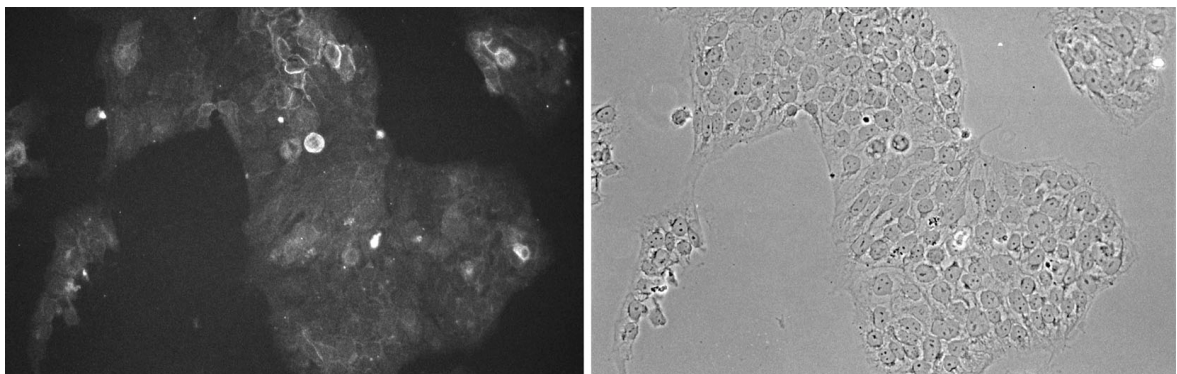
Die RNA der verschiedenen Transfektanten wurde nach Abschluß der beiden Versuchsreihen isoliert, elektrophoretisch getrennt und nach dem Transfer auf eine Nylonmembran mit der jeweiligen Cx-cDNA-Sonde hybridisiert. Die Membranen mit RNA der Cx26- und Cx43-Transfektanten wurden nach Abwaschen der cDNA-Sonde mit einer Cx40-cDNA-Sonde rehybridisiert, um zusätzlich die endogene Expression von Cx40 zu ermitteln.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigten die Vermutung eines veränderten Connexinspektrums in der wiederholten Versuchsreihe:

2.3 Immunhistochemie und RNA-Analyse der Cx26-Transfektanten

Abb. 10: Immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von Cx26 an einem Cx26-Transfektanten des Wiederholungsversuchs (15. Woche in Kultur).

Der Transfektant zeigte gegenüber den Voraufnahmen zur ersten Versuchsreihe einen Verlust der Cx26-Expression.

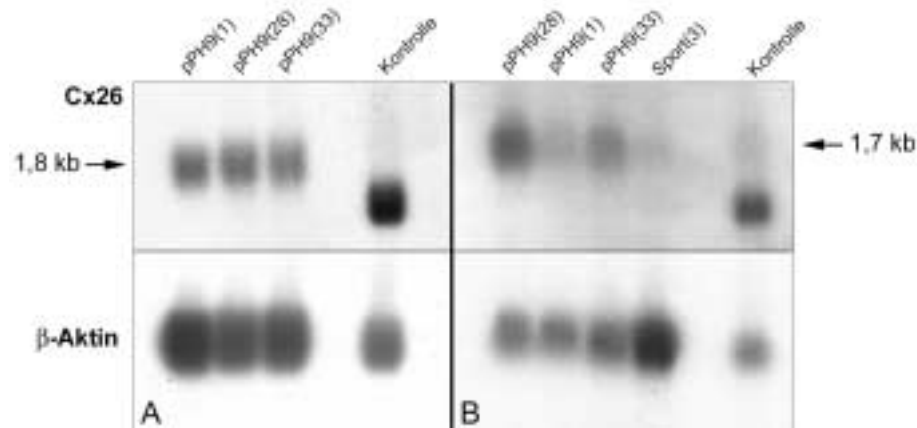


Bei den Cx26-Transfektanten konnte nach Abschluß des zeitlich späteren Wiederholungsversuchs kein Cx26 immunhistochemisch mehr nachgewiesen werden.

Abb. 11: Autoradiogramm der RNA-Analyse von Cx26-Transfektanten der ersten Versuchsreihe (A) und der wiederholten Versuchsreihe (B) nach Hybridisierung mit einer Cx26-cDNA-Sonde und einer β -Actin-Kontrolle.

A: Die Abbildung zeigt das exogene Cx26-Transkript (Soll: 1,2 kb) der Transfektanten

B: Die Abbildung zeigt im Gegensatz zum ersten Hybridisierungsexperiment unterschiedlich starke Signale für das exogene Cx26-Transkript. Der Puro-Klon mit dem Leervektor Sport (3) zeigt kein Signal.

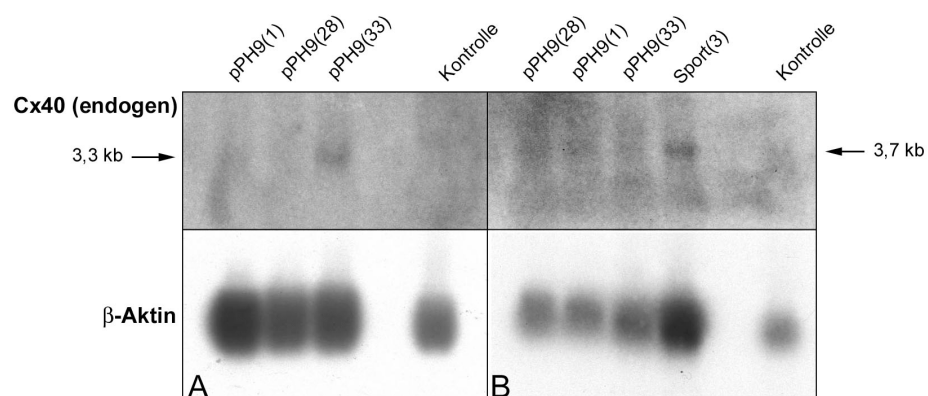


Auch auf mRNA-Ebene ließ sich eine Reduktion der Transkriptionsrate feststellen. Waren die mRNA-Konzentrationen für die exogenen Cx26-Transkripte im ersten Hybridisierungsexperiment für alle drei Transfektanten auf dem gleichen Level, so sank die detektierbare mRNA-Konzentration im zweiten Blot insbesondere für pH9(1), was dessen starke Proliferation in der wiederholten Versuchsreihe erklären könnte.

Abb. 12: Autoradiogramm der RNA-Analyse von Cx26-Transfektanten der ersten Versuchsreihe (A) und der wiederholten Versuchsreihe (B) nach Hybridisierung mit einer Cx40 c-DNA-Sonde zur Bestimmung der endogenen Cx40-Transkription.

A: Es sind schwache Signale für das endogene Cx40-Transkript (Soll: 3,3 kb) erkennbar. Am deutlichsten ist das Signal für pH9(33) erkennbar.

B: Die Cx26-Transfektanten zeigen insgesamt nur ein schwaches, der Puro-Klon mit dem Leervektor Sport(3) dagegen ein deutlicheres Signal für das endogene Cx40-Transkript (Soll: 3,3 kb).

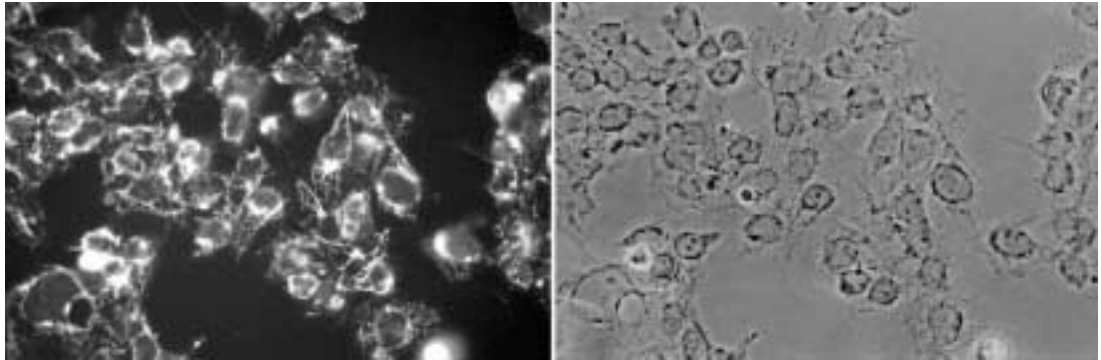


Ein Gehalt an endogenem Cx40-Transkript bei den Cx26-Transfektanten war in beiden Northern-Blots nur schwach nachweisbar (Abb. 12).

2.4 Immunhistochemie und RNA-Analyse der Cx43-Transfektanten

Abb. 13: Immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von Cx43 am Klon pPH17(19) des Wiederholungsversuchs (15. Woche in Kultur).

Klon pPH17(19) zeigte gegenüber den Voraufnahmen einen Verlust der Cx43-Expression. Vereinzelt sind intrazellulär gelegene Signale zu erkennen.



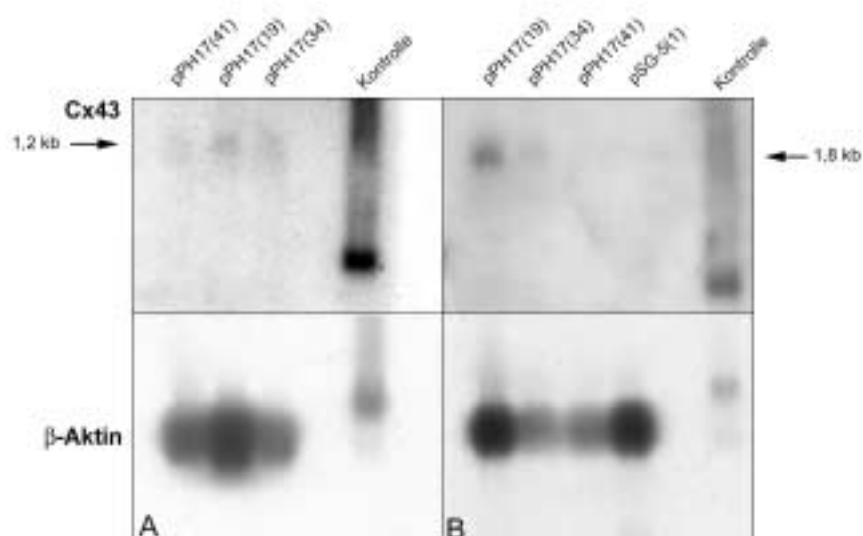
Bei den Cx43-Transfektanten konnte nach Abschluß der wiederholten Versuchsreihe immunhistochemisch kein Cx43 mehr bei dem Klon pPH17(19) nachgewiesen werden. Allenfalls sind intrazellulär gelegene Signale zu erkennen (Abb.13). Die anderen beiden Transfektanten haben ihr Connexin hingegen behalten.

Dieser Cx43-Verlust spricht für den Proliferationsschub des Klons pPH17(19) gegenüber den anderen beiden Transfektanten.

Abb. 14: Autoradiogramm der RNA-Analyse von Cx43-Transfektanten der ersten Versuchsreihe (A) und der wiederholten Versuchsreihe (B) nach Hybridisierung mit einer Cx43-cDNA-Sonde und einer β -Actin-Kontrolle.

A: Die Abbildung zeigt nur sehr schwache Signale für das exogene Cx43-Transkript (Soll: 1,14 kb) der Transfektanten.

B: Die Abbildung zeigt, wie im ersten Hybridisierungsexperiment, nur schwache Signale für das exogene Cx43-Transkript bei Klon pPH17(34) und (41). Für Klon pPH17(19) ist das Signal am deutlichsten erkennbar. Der Puro-Klon mit dem Leervektor pSG-5(1) zeigt kein Signal.

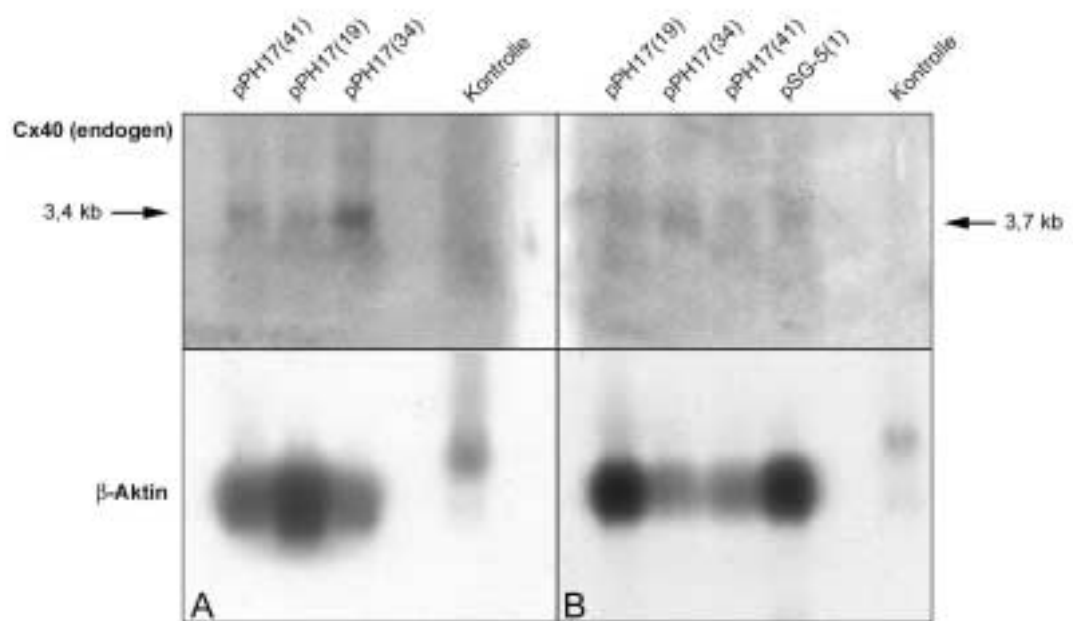


Die Banden auf beiden Autoradiogrammen erwiesen sich insgesamt als sehr schwach. Am deutlichsten konnte ein Signal für das exogene Cx43-Transkript des Klons pPH17(19) detektiert werden (Abb. 14).

Abb. 15: Autoradiogramm der RNA-Analyse von Cx43-Transfektanten der ersten Versuchsreihe (A) und der wiederholten Versuchsreihe (B) nach Hybridisierung mit einer Cx40 c-DNA-Sonde zur Bestimmung der endogenen Cx40-Transkription.

A: Die Cx43-Transfektanten zeigen unterschiedlich starke Signale für das endogene Cx40-Transkript (Soll: 3,3 kb). Am deutlichsten ist das Signal für Klon pPH17(34).

B: Die Cx43-Transfektanten zeigen insgesamt nur schwache Signale für das endogene Cx40-Transkript, wobei erneut das Signal für pPH17(34) am deutlichsten erkennbar ist. Der Puro-Klon mit dem Leervektor pSG-5(1) besitzt nur ein schwaches Signal.

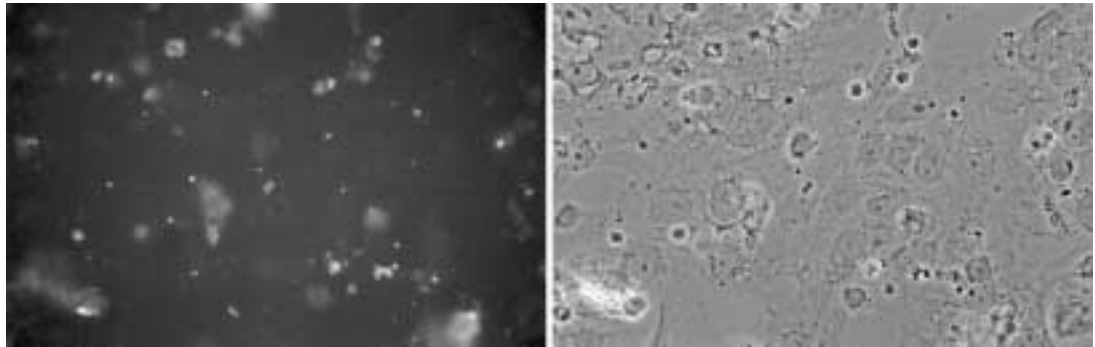


Endogene Cx40 mRNA war am deutlichsten für pPH17(34) in den Hybridisierungsexperimenten nachweisbar (Abb. 15).

2.5 Immunhistochemie und RNA-Analyse der Cx40-Transfektanten

Abb. 16: Immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von Cx40 an einem Cx40-Transfektanten des Wiederholungsversuchs (14. Woche in Kultur).

Der Transfektant zeigte gegenüber den Voraufnahmen einen Verlust der exogenen Cx40-Expression.



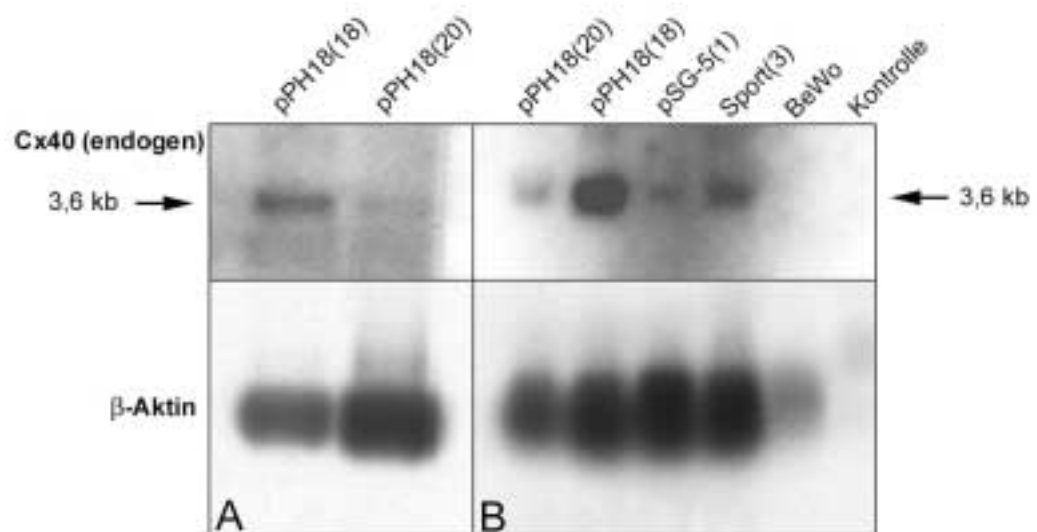
Bei den beiden Cx40-Transfektanten konnte nach Abschluß der wiederholten Versuchsreihe ebenfalls kein Cx40 immunhistochemisch mehr nachgewiesen werden, (Abb. 16).

Es konnte allenfalls eine geringe endogene Cx40-Expression festgestellt werden.

Abb. 17: Autoradiogramm der RNA-Analyse von Cx40-Transfektanten der ersten Versuchsreihe (A) und der wiederholten Versuchsreihe (B) nach Hybridisierung mit einer Cx40 c-DNA-Sonde und einer β -Actin-Kontrolle.

A: Die Abbildung zeigt lediglich das endogene Cx40-Transkript (Soll: 3,3 kb) der Transfektanten. Das Signal war für Klon pPH18(18) stärker als für Klon pPH18(20).

B: Die Abbildung zeigt ebenfalls unterschiedlich starke Signale für das endogene Cx40-Transkript. Unter den Cx40-Transfektanten war das Signal bei pPH18(18) erneut stärker als bei pPH18(20). Unter den Puro-Klonen war das Signal mit dem Leervektor Sport(3) stärker als mit dem Leervektor pSG-5(1). Die Menge der RNA von den parentalen BeWo-Zellen war für eine Beurteilung unzureichend.



Auf mRNA-Ebene konnte bereits im ersten Hybridisierungsexperiment das exogene Cx40-Fragment (1,16 kb) nicht mehr detektiert werden. Die mRNA wurde aber auch erst 3-5 Wochen nach der ersten Versuchsreihe isoliert. Auf beiden Autoradiogrammen war lediglich das endogene Cx40-Transkript (3,3 kb) nachweisbar (Abb. 17).

In beiden Hybridisierungsexperimenten war die endogene Cx40 mRNA-Konzentration bei Klon pPH18(18) höher als bei Klon pPH18(20).

Der Verlust des exogenen Cx40 und damit der Verlust einer homogenen Cx40-Expression führte nach diesen Ergebnissen zu einem Proliferationsverlust. Die höhere Proliferationsaktivität des Klon pPH18(18) gegen pPH18(20) nach dem Verlust des exogenen Transkriptes scheint auf die endogene Cx40-Expression zu beruhen.

Dies ließ sich durch die RNA-Analyse bestätigen, wo Klon pPH18(18) eine höhere endogene Cx40 Transkriptionsrate aufwies als Klon pPH18(20).

Zusammenfassend ließen sich folgende Ergebnisse aus den beiden Versuchsreihen ziehen:

1. Die stabile Transfektion von BeWo-Zellen mit Cx-Genen führte zunächst zu einer homogenen exogenen Cx-Expression, die sich immunhistochemisch nachweisen ließ. Im Laufe der Kultivierung veränderte sich jedoch das Cx-Spektrum der Transfektanten. Sie zeigten nach längerer Zeit in Kultur eine Abnahme ihrer Connexin-Expression. Zumindest auf Proteinebene war ein immunhistochemischer Nachweis limitiert.
Obwohl auf Proteinebene kein Nachweis von Connexinen mehr möglich war, konnten auf mRNA-Ebene trotzdem exogene Cx-Transkripte nachgewiesen werden.
2. Cx26- und Cx43-Expression führte zu einer Proliferationshemmung der transfizierten BeWo-Zellklone. Ein Verlust dieser Connexine führte wieder zu einer verstärkten Induktion der Proliferation.
Eine homogenere Cx40-Expression, die zusätzlich durch das exogen eingebrachte Cx40-Transkript erzielt wurde, führte zu einer verstärkten Proliferation. Verlust dieses exogen eingebrachten Connexins führte zu einer verminderten Proliferation. Der Grad endogener Cx40-Expression schien dann maßgebend für die Proliferationsstärke zu sein.
3. Die Puromycin-Klone mit den transfizierten Leervektoren pSG-5(1) und Sport(3) erzielten die geringsten Proliferationsraten.

3. β -hCG-Hormonproduktion von verschiedenen BeWo-Connexin-Transfektanten im Vergleich zu ihren Puromycin-Klonen und den parentalen BeWo-Zellen

Ein funktionelles Charakteristikum von Chorionkarzinomen ist die Produktion von Plazentahormonen. Sie können als Differenzierungsparameter herangezogen werden (Kliman et al., 1986 und Kohler et al., 1971).

Am Beispiel der β -hCG-Produktion wurde untersucht, ob sich Unterschiede in der Hormonproduktion und somit in der Differenzierung zwischen Transfektanten, Puromycin-Klonen und der parentalen BeWo-Zelllinie feststellen lassen konnten.

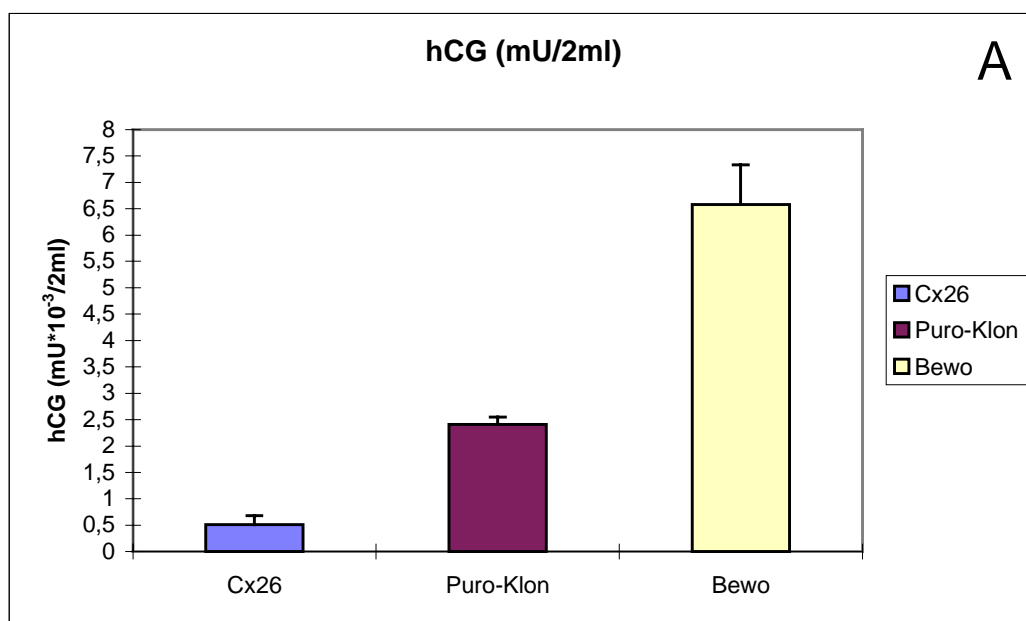
Dazu wurde das Medium in den 12-Loch-Kammern, welches am 10. Tag der Proliferation zu je 1 ml entnommen wurde, auf β -hCG hin untersucht. Es wurde 24 h zuvor durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Die verschiedenen Hormonkonzentrationen für Transfektant, Puro-Klon und parentale BeWo-Zelllinie wurden als mU pro 2 ml pro Zelle und pro 24 h ausgewertet und graphisch als Säulendiagramm dargestellt.

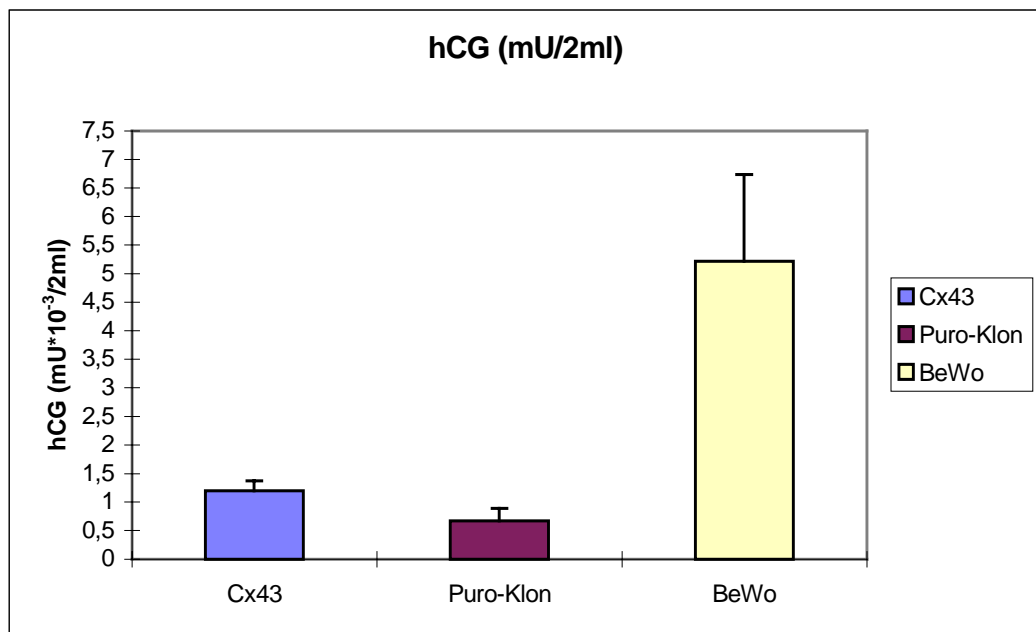
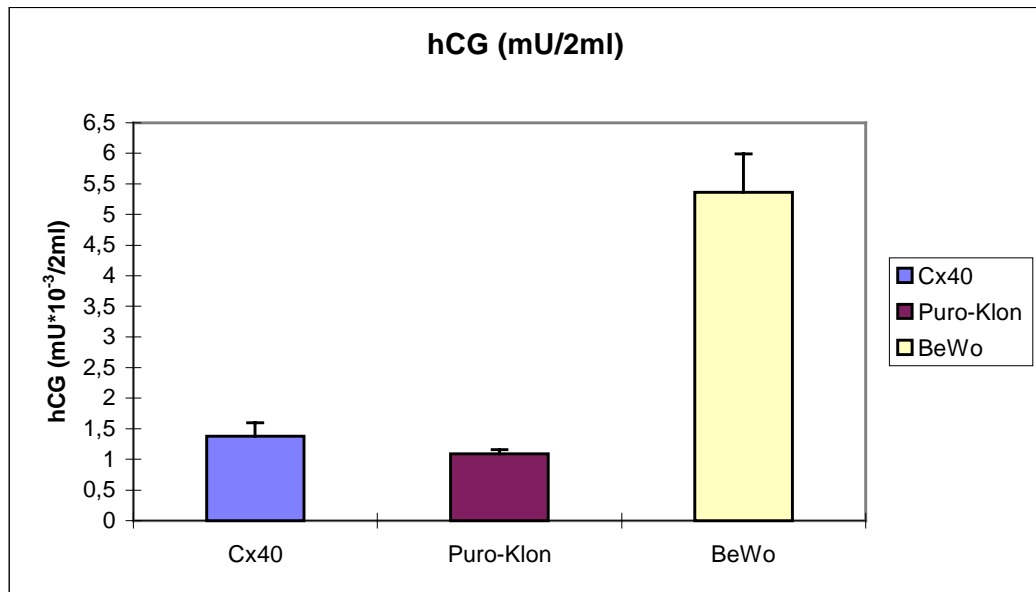
Folgende Ergebnisse stellten sich dar:

3.1 β -hCG-Hormonproduktion exemplarischer Cx-Transfektanten der ersten Versuchsreihe

Abb. 18: β -hCG-Hormonproduktion eines Cx26-Transfektanten (A), eines Cx40-Transfektanten (B) und eines Cx43-Transfektanten (C) mit ihren entsprechenden Puromycin-Klonen und der parentalen BeWo-Zellen am 10. Tag der ersten Versuchsreihe.

Die Cx-Transfektanten sowie die Puromycin-Klone zeigten im Vergleich zu den BeWo-Zellen eine deutlich geringere β -hCG-Hormonproduktion.





Die Erwartung, daß die transfizierten Zellklone durch ihr Connexin neben der Proliferationshemmung auch eine verstärkte Differenzierung zeigten, ließ sich hinsichtlich der β -hCG-Sekretion nicht bestätigen.

Sämtliche Cx-Transfektanten lagen mit ihren β -hCG-Werten deutlich unter der parentalen BeWo-Zelllinie. Diese wies in allen Abbildungen die höchsten β -hCG-Werte auf.

Auch die Puro-Klone lagen in ihren β -hCG-Werten wesentlich unter denen der parentalen BeWo-Zellen.

Ein Vergleich von Cx-Klon und seinem jeweiligen Puro-Klon zeigt keinen signifikanten Effekt des exogenen Connexins auf die Differenzierung.

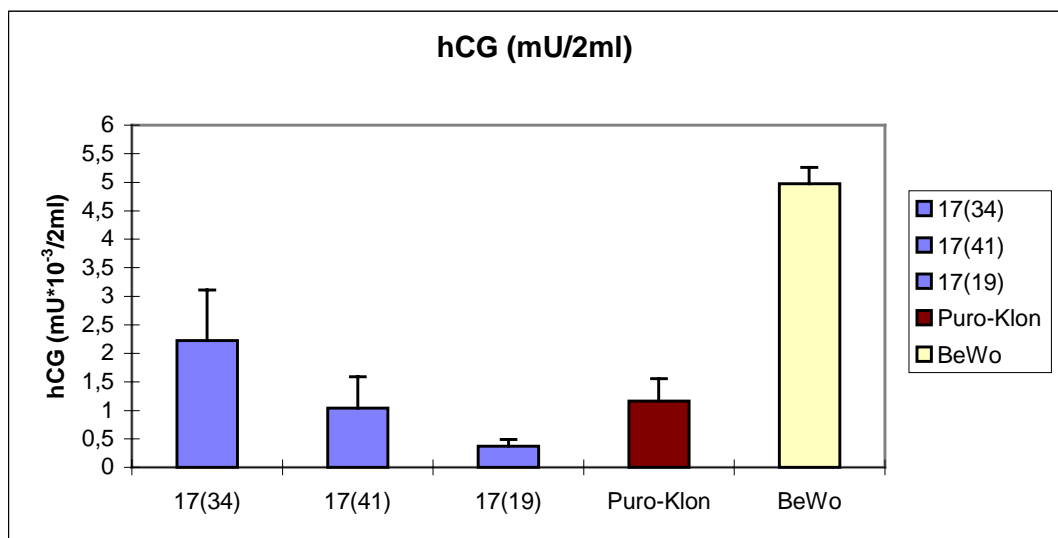
3.2 β -hCG-Hormonproduktion der Cx-Transfektanten im Wiederholungsansatz

Der exogene Cx-Verlust der Cx26-Transfektanten und der Cx40-Transfektanten im Wiederholungsansatz führte zu keinen signifikanten Änderungen auf die β -hCG-Produktion. Die β -hCG-Werte von Cx-Transfektanten, Puro-Klonen und parentalen BeWo-Zellen bestätigten vielmehr die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe.

Einzig und allein die β -hCG-Werte der Cx43-Transfektanten deuteten eine Korrelation von positiver Cx43-Expression und höherer β -hCG-Produktion an (Abb. 19).

Abb. 19: β -hCG-Hormonproduktion der Cx43-Transfektanten (pPH17(34), (41) und (19)), des Puromycin-Klons mit dem Leervektor pSG-5(1) und der parentalen BeWo-Zellen am 10. Tag der wiederholten Versuchsreihe.

Klon pPH17(34), der als Einziger der Cx43-Transfektanten eine homogene Cx43-Expression zu diesem Zeitpunkt aufwies, zeigte gegenüber den anderen Cx43-Transfektanten die höchste β -hCG-Hormonproduktion. Mit abnehmender Cx43-Expression sanken tendentiell auch die β -hCG-Werte.



Bei Klon pPH17(34) konnte unmittelbar nach dieser Versuchsreihe eine positive Cx43-Expression nachgewiesen werden und bei Klon pPH17(41) wenig später ebenfalls eine positive, aber schwächere Cx43-Expression. Bei Klon pPH17(19) blieb eine positive Cx43-Expression dagegen aus.

Zusammenfassend ließen sich folgende Beobachtungen machen:

In sämtlichen Versuchsreihen fand man mit Abstand die höchsten β -hCG-Werte bei den parentalen BeWo-Zellen. Die Werte der Cx-Transfektanten und Puromycin-Klone lagen mit etwa 3-4 milli Units signifikant darunter. Dies entspricht einer durchschnittlich geringeren Hormonproduktion von 70-80%.

Diese Feststellung führte zu der Vermutung, daß die Puromycin-Selektion, unter welcher die Cx-Transfektanten und Puromycin-Klone, nicht aber die parentale BeWo-Kontrolle standen, offenbar erneut einen toxischen Einfluß auf die Transfektanten ausübt.

Dies wurde bereits bei der Kultivierung von Cx-26-Transfektanten in den Vorversuchen beschrieben, die unter einem höheren Selektionsdruck von 1,0 mg/ml standen und eine Apoptose zeigten. Die neueren Versuchsreihen zeigen, daß Puromycin in niedrigerer Dosierung zwar nicht zum Absterben der Transfektanten führt, möglicherweise aber einen entscheidenden, supprimierenden Effekt auf die β -hCG-Produktion hat und damit die Differenzierung der Transfektanten hemmt.

Vergleicht man unter diesem Gesichtspunkt lediglich die β -hCG-Werte zwischen Cx-Klon und Puro-Klon, so konnte sich in einigen Beispielen tendenziell eine Korrelation von höherer Differenzierung bei höherem endogenen oder exogenen Cx-Gehalt feststellen lassen. Diesen Schluß konnte man v. a. bei Vergleich der Cx43-Transfektanten der wiederholten Versuchsreihe mit ihrem Puromycin-Klon mit dem transfizierten Leervektor pSG-5(1) ziehen, der nur eine schwache endogene Cx40-Transkriptionsrate aufwies. Eine positive exogene Cx43-Expression bei den Cx43-Transfektanten führt zu einer höheren Differenzierung und verhilft trotz des potentiell supprimierenden Puromycin-Effektes somit zu höheren β -hCG-Werten als bei den Puromycin-Klonen.

Bei den Cx26-Transfektanten dagegen bewirkte ein Cx-Verlust bei gleich schwachen endogenen Cx40 mRNA-Levels keine signifikante Änderung der β -hCG-Produktion. Wohl aber scheint die höhere mRNA-Konzentration für das endogene Cx40 beim Puro-Klon mit dem Leervektor Sport(3) für dessen größere Hormonproduktion verantwortlich zu sein, (s. Abb. 12).

Insgesamt ist aber festzuhalten, daß solche Unterschiede hinsichtlich der β -hCG-Produktion innerhalb der Transfektanten in Abhängigkeit vom Grad der endogenen und exogenen Cx-Expression bzw. mRNA-Konzentration nur Tendenzen zeigen. Allgemeingültige signifikante Unterschiede, die für alle Transfektanten in den beiden Versuchsreihen gelten, konnten nicht erhoben werden.

Vielmehr steht die signifikant geringere Hormonproduktion der unter dem Selektionsdruck stehenden Cx-Transfektanten und Puro-Klone gegenüber der parentalen BeWo-Zellen im Vordergrund.

4. Einfluß des Puromycin-Selektionsdruckes auf Proliferation und β -hCG-Hormonproduktion

Um den Einfluß des Puromycin-Selektionsdruckes auf Proliferation und β -hCG-Produktion von Cx-Transfektant und Puromycin-Klon näher zu untersuchen, wurde eine Proliferationsreihe an zwei Cx43-Transfektanten und am Puro-Klon mit dem transfizierten Leervektor pSG5-(1) unter Berücksichtigung unterschiedlicher Puromycinkonzentrationen durchgeführt.

4.1 Proliferationsverhalten und β -hCG-Hormonproduktion bei verschiedenen Puromycinkonzentrationen am Beispiel zweier Cx43-Transfektanten

Vor Beginn der Proliferationsreihe wurden die beiden Cx43-Transfektanten pPH17(34) und pPH17(19) unter folgenden drei verschiedenen Puromycinkonzentrationen über einen Zeitraum von 2-3 Wochen in Kultur gehalten: 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml und 0,75 mg/ml.

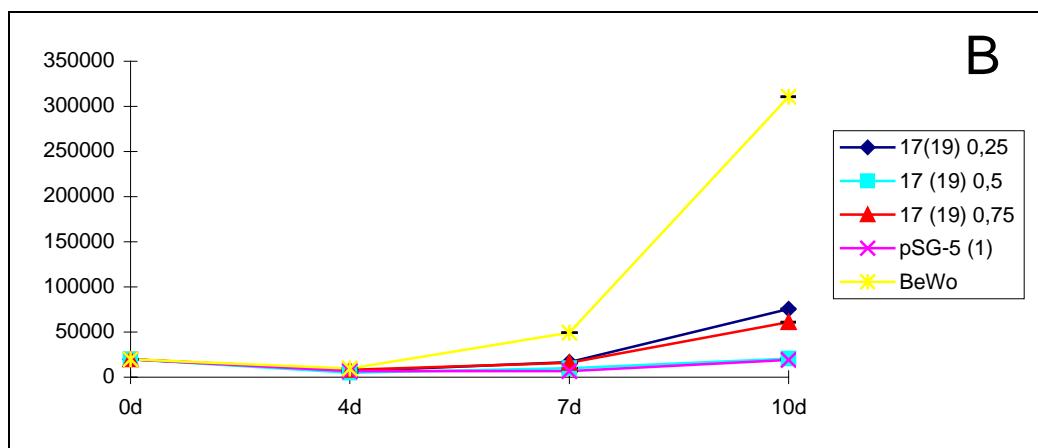
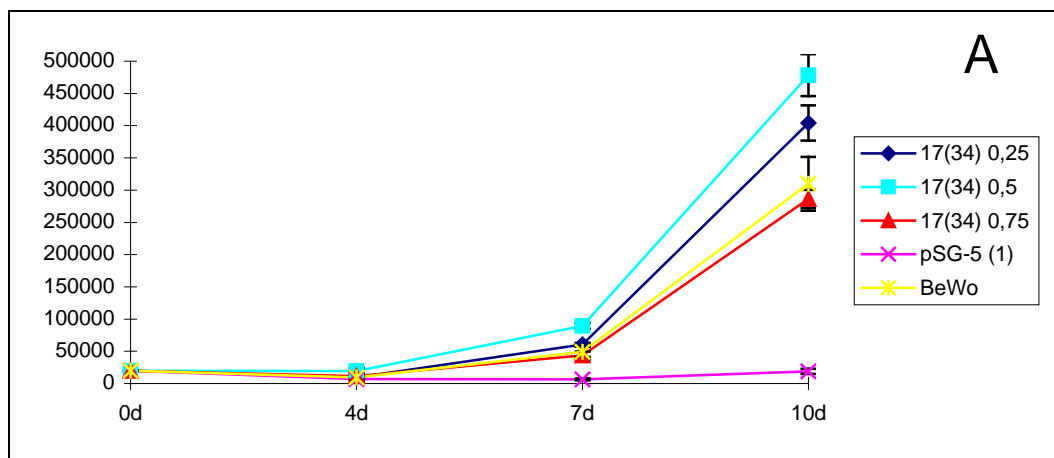
Anschließend wurden jeweils 20000 Zellen zur Ermittlung der Teilungsrate ausgesät, ihre Zellzahl am 4., 7. und 10. Tag bestimmt und die β -hCG-Konzentration an den am 10. Tag entnommenen Medien analysiert.

Zum Zeitpunkt der Aussaat der beiden Cx43-Transfektanten konnte immunhistochemisch keine Cx43-Expression mehr nachgewiesen werden.

Folgende Ergebnisse konnten festgestellt werden:

Abb. 24: Proliferationskurven zweier Cx43-Transfektanten (A: pPH17(34); B: pPH17(19)) in Abhängigkeit von drei verschiedenen Puromycin-Konzentrationen (0,25; 0,5 und 0,75 mg/ml) sowie des Puro-Klons mit dem Leervektor pSG-5(1) bei unveränderter Puromycin-Konzentration und der parentalen BeWo-Zellen.

Eine Abhängigkeit von Zellteilungsrate und Puromycin-Konzentration konnte nicht festgestellt werden. Klon pPH17(34) zeigte eine höhere Zellteilungsrate als pPH17(19).



Zunächst erwiesen sich beide Transfektanten in ihrer Proliferationsgeschwindigkeit sehr heterogen. Der Klon pPH17(19) hatte wesentlich geringere Zellzahlen als pPH17(34). Eine Erklärung könnte die höhere mRNA-Konzentration für Cx43 bei Klon 17(19) und die stärkere endogene Cx40-mRNA-Konzentration bei 17(34) sein (s. Abb. 14 und 15).

Klon 17(34) lag sowohl bei 0,25 mg/ml als auch bei 0,5 mg/ml Puromycin-Konzentration in seinen Zellzahlen höher als bei den BeWo-Zellen. Die Zellzahlen bei 0,75 mg/ml Selektionsdruck lagen nur knapp unter der BeWo-Zellkurve.

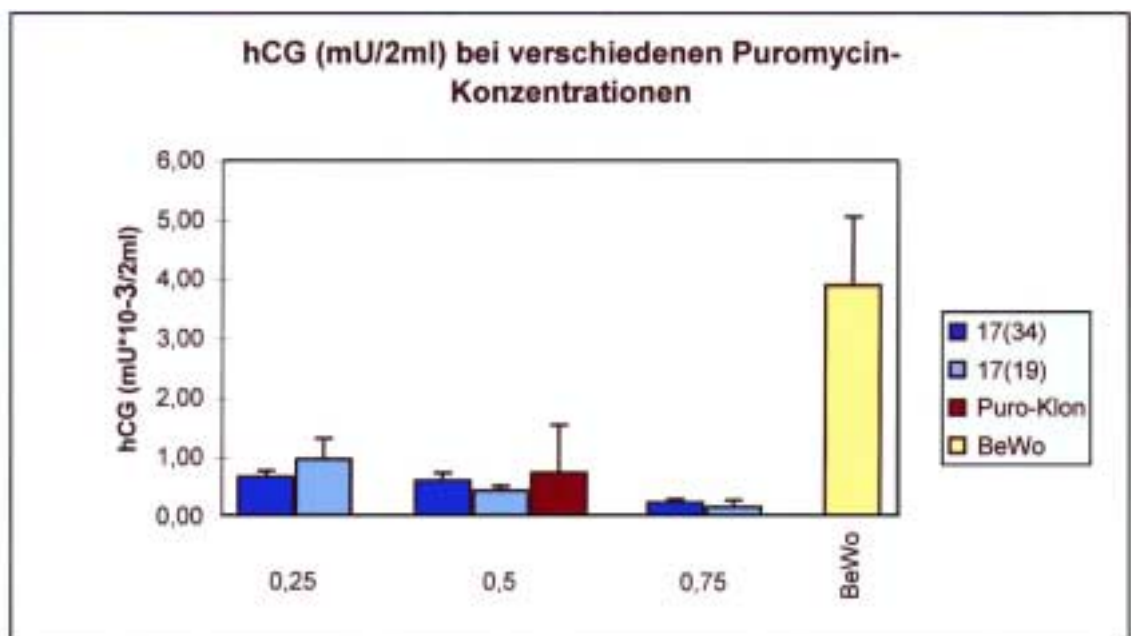
Einen Einfluß der Puromycinkonzentration in Form einer Proliferationshemmung konnte sich an diesem Cx43-Klon somit nicht bestätigen lassen, zumal der Puro-Klon mit dem Leervektor pSG5(1), der bei 0,5 mg/ml Selektionsdruck geführt wurde, im Gegensatz dazu kaum Wachstum zeigte (Abb. 24 A).

Klon 17(19) war zwar insgesamt im Wachstum gehemmt, eine eindeutige Korrelation der verschiedenen Puromycin-Konzentrationen zur Proliferationsgeschwindigkeit konnte aber ebenfalls nicht festgestellt werden (Abb. 24 B).

Abb. 25: β -hCG-Hormonproduktion der bei verschiedenen Puromycin-Konzentrationen kultivierten Cx43-Transfektanten (pPH17(34) = dunkelblau und pPH17(19) = hellblau), des Puro-Klons mit dem Leervektor pSG-5(1) und der parentalen BeWo-Zellen.

Die β -hCG-Werte wurden an den am 10. Tag der Versuchsreihe entnommenen Medien analysiert. Die Puromycin-Konzentrationen in den Medien der Cx43-Transfektanten lagen bei 0,25; 0,5 und 0,75 mg/ml.

Die Abb. zeigt eine Korrelation von β -hCG-Hormonproduktion und Puromycin-Konzentration: Je niedriger die Puromycin-Konzentration desto höher sind die β -hCG-Werte.



Die β -hCG-Analyse bestätigte dagegen eine Korrelation zwischen Puromycin-Konzentration und β -hCG-Produktion.

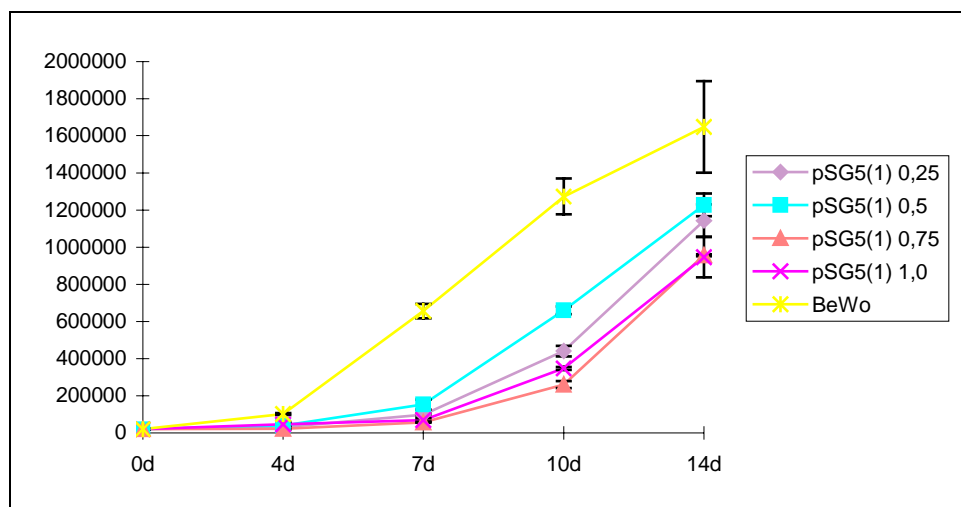
Je niedriger der Puromycin-Selektionsdruck war, desto höher die Werte der β -hCG-Hormonproduktion. Der bei 0,5 mg/ml Puromycin gehaltene Leervektor lag im β -hCG-Wert ebenfalls über den β -hCG-Werten der bei 0,75 mg/ml gehaltenen Cx43-Transfektanten.

Wiederum die höchsten β -hCG-Werte erzielte die parentale BeWo-Kontrolle.

4.2 Proliferationsverhalten und β -hCG-Hormonproduktion bei verschiedenen Puromycinkonzentrationen am Beispiel des Puromycin-Klons mit dem pSG5-(1)-Leervektor

Anschließend wurde der Puromycin-Klon mit dem Leervektor pSG-5(1), der nur über eine schwache endogene Cx40 mRNA verfügte, unter den Puromycinkonzentrationen 0,25 , 0,5 , 0,75 und 1,0 mg/ml hinsichtlich Proliferation und β -hCG-Produktion untersucht.

Abb. 26: Proliferationskurven des bei verschiedenen Puromycin-Konzentrationen kultivierten Puro-Klons mit dem transfizierten Leervektor pSG-5(1) und der parentalen BeWo-Zellen. Die Puromycin-Konzentrationen lagen bei 0,25 , 0,5 , 0,75 und 1,0 mg/ml Medium. Bei dem Puro-Klon ließ sich tendentiell eine höhere Zellteilungsrate feststellen, je niedriger die Puromycin-Konzentration war.



Die Untersuchungen ergaben, daß die parentale BeWo-Zellkurve die stärkste Proliferationsrate zeigte. Keine der vier Puro-Klone konnte sich der Proliferationsgeschwindigkeit der parentalen BeWo-Zelllinie nähern.

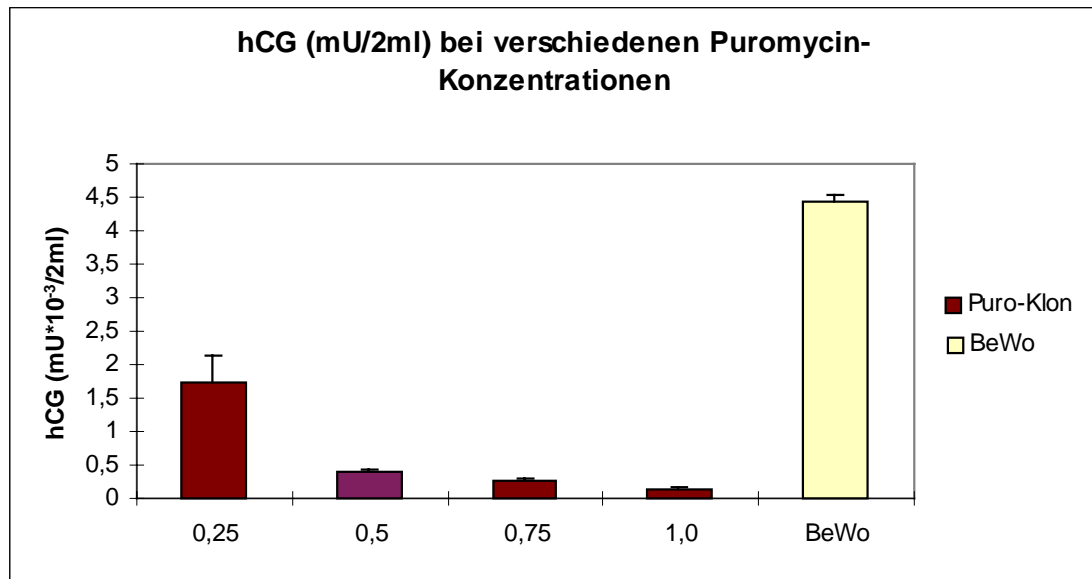
Gleichwohl zeigte sich eine von der Puromycin-Dosis abhängige Proliferationsgeschwindigkeit unter den Puromycin-Klonen.

Die höchsten Zellzahlen erreichten die unter 0,25 und 0,5 mg/ml Selektionsdruck gehaltenen Klone (Abb.26), während die unter 0,75 und 1,0 mg/ml Puromycin gehaltenen Puro-Klone eine geringere Proliferationsrate aufwiesen.

Abb. 27: β -hCG-Hormonproduktion des bei verschiedenen Puromycin-Konzentrationen kultivierten Puro-Klons mit dem transfizierten Leervektor pSG-5(1) und der parentalen BeWo-Zellen.

Die β -hCG-Werte wurden an den am 10. Tag der Versuchsreihe entnommenen Medien analysiert.

Die Abb. zeigt auch beim Puromycin-Klon eine Abhängigkeit der Höhe der β -hCG-Werte von der Puromycin-Konzentration im Medium: Je niedriger die Puromycin-Konzentration desto höher sind die β -hCG-Werte.



Noch deutlicher zeigte sich eine Puromycin-Dosis-Abhängigkeit in der β -hCG-Produktion. Je niedriger die Puromycin-Konzentration im Medium der Puro-Klone war, desto höher die Werte der β -hCG-Hormonproduktion.

Zusammenfassung:

Eine Korrelation von Puromycin-Dosis und Proliferationsgeschwindigkeit ließ sich nur bei dem Puromycin-Klon mit dem transfizierten pSG5-(1)-Leervektor feststellen, der lediglich über eine schwache endogene Cx40-mRNA verfügte.

Solange auf Transkriptionsebene stärkere endogene Cx40-mRNA- oder exogene Cx43-mRNA-Konzentrationen detektierbar waren (wie am Beispiel der beiden Cx43-Transfektanten), so war eine eindeutige Abhängigkeit von Puromycin-Konzentration und Proliferationsgeschwindigkeit nicht gegeben.

Eine deutliche Abhängigkeit der Puromycin-Dosis zeigte sich dagegen auf die Stärke der β -hCG-Hormonproduktion. Sowohl bei den Cx43-Transfektanten als auch bei dem Puro-Klon mit dem Leervektor pSG-5(1) sanken die β -hCG-Hormonwerte mit steigendem Puromycin-Selektionsdruck.

Folgende Ergebnisse stellten sich dar:

1. Ein 1 kb-Transkript des Puromycin-Resistenzgens konnte bei allen untersuchten Cx-Transfektanten und den Puromycin-Klonen nicht nachgewiesen werden.
2. Das Signal des pPH9(33)-Klons der ersten Versuchsreihe im kleinen kb-Bereich läßt sich nicht dem pac-Transkript zuordnen (Abb.27 A). Möglicherweise ist ein Kettenabbruch beim Ablesen des pac-Gens für diese Bande verantwortlich oder es handelt sich um eine Kreuzreaktion.
3. Sämtliche Autoradiogramme zeigen starke Signale im 4,2 - 4,4 kb-Bereich. Dabei handelt es sich offenbar um eine Kreuzreaktion der verwendeten Puromycin-cDNA-Sonde mit der 28sRNA.

Die RNA-Analyse ergab, daß offenbar das Puromycin-N-acetyltransferase-(pac)-Gen nicht in ausreichendem Maße transkribiert wurde. Es konnte kein Signal für das postulierte 1 kb mRNA-Fragment detektiert werden.

Warum die transfizierten Zellen im Verlauf ihrer Kultivierung die Transkription des pac-Gens herunterreguliert oder gar eingestellt haben, welche Vorgänge dabei eine Rolle gespielt haben können und wie die Zellen ohne die Puromycin-N-acetyltransferase die Einwirkung des Puromycins tolerierten, soll u.a. Gegenstand der Diskussion sein.

6. Tumorwachstum im Nacktmausmodell

Um das Proliferationsverhalten Cx-transfizierter BeWo-Zellklone mit parentalen BeWo-Zellen nicht nur *in-vitro*, sondern auch *in-vivo* miteinander zu vergleichen, wurde je ein positiver Klon der drei Connexine sowie die parentale BeWo-Zelllinie, wie in Kapitel 6 unter Material und Methoden beschrieben, in einer Menge von 10^6 Zellen subkutan in die Flanken der Nacktmäuse eingebracht.

Es standen jeweils drei Nacktmäuse für die Applikation eines Klons zur Verfügung. Die auserwählten Klone der Cx-Transfektanten 26, 40 und 43 wurden zuvor immunhistochemisch auf eine homogene Cx-Expression an der Zellmembran überprüft. Über einen Zeitraum von 8-12 Wochen wurden regelmäßig die Nacktmäuse auf eine Tumorentwicklung hin beobachtet und der Injektionsort durch Abtasten inspiziert.

Während dieser Zeit ließ sich weder bei den Cx-Transfektanten, noch bei den parentalen BeWo-Zellen ein induziertes Tumorwachstum bei den Nacktmäusen feststellen.

Somit konnten für die BeWo-Zellen und ihre Transfektanten im Gegensatz zu Jeg-3 u.a. Chorionkarzinomzellen keine Tumoren im Nacktmausmodell etabliert werden.

Dies bedeutet, daß es sich bei der BeWo-Zelllinie im klassischen Sinne um keine Tumorzelllinie handelt, da man von einer klassischen Tumorzelllinie im Nacktmausmodell erwartet, daß sie anwächst und Tumoren *in vivo* ausbildet.

D. Diskussion

1. Connexine regulieren Wachstums- und Differenzierungsvorgänge in verschiedenen Geweben

Das Invasionsvermögen des Trophoblasten wurde häufig mit dem von Tumorzellen verglichen (Yagel et al., 1989; Strickland und Richards, 1992). Im Gegensatz zum kontrolliert invasiven Wachstum des Trophoblasten der humanen Plazenta, stellt das weibliche Chorionkarzinom eine Tumorform dar, die sich durch unkontrolliertes invasives Wachstum dieser Zellen auszeichnet.

Der entscheidende Unterschied zwischen diesen invasiven Tumorzellen und invasiven Trophoblastzellen besteht in dem örtlich und zeitlich begrenzten Proliferations- und Invasionspotential des Trophoblasten während der Plazentation.

Chorionkarzinomzelllinien werden oft als *in vitro*-Modell für die frühe Implantationsphase des humanen Trophoblasten verwendet, in der die Trophoblastzellen zahlreiche Tumoreigenschaften ihrer malignen Variante annehmen, z.B die Expression von proteolytischen Proteinen, die für die Auflösung extrazellulärer Matrix notwendig sind (Librach et al., 1991), ein verändertes Integrinmuster (Damsky et al., 1993) und die Expression von Pro-Onkogenen wie *cerb-B-2* (Mühlhauser et al., 1991). Neben diesen Gemeinsamkeiten von Chorionkarzinom und Trophoblastzellen, besteht jedoch der entscheidende Unterschied in der kontrollierten Invasivität des Trophoblasten *in vivo*: Die invasive Phase des Trophoblasten ist räumlich auf das Endometrium und zeitlich auf das erste Drittel der Schwangerschaft begrenzt, während das Chorionkarzinom eine unbegrenzte Invasivität zeigt.

Welche Regulationsmechanismen im einzelnen an dieser Begrenzung der invasiven und proliferativen Phase der Trophoblastzellen beteiligt sind, ist noch nicht genau bekannt.

Welchen Anteil Gap-junctions, die Vermittler der direkten zytoplasmatischen Zell-Zell-Kommunikation, an dieser Kontrolle von Proliferation, Invasion und Differenzierung haben, sollte durch Transfektionsexperimente an der Chorionkarzinomzelllinie BeWo aufgezeigt werden. Chorionkarzinome unterliegen in ihrem Proliferations- und Invasionsverhalten nicht mehr den normalen Regulationsmechanismen. Die drei Chorionkarzinomzelllinien BeWo (Patillo und Gey, 1968), Jeg-3 (Kohler und Bridson, 1971) und JAr (Patillo et al., 1971) wurden in verschiedenen Experimenten hinsichtlich ihrer Trophoblast- und Tumoreigenschaften intensiv untersucht. Grümmer et al., (1994), stellten ein unterschiedliches Invasionsverhalten von BeWo, Jeg und JAr Multizellsphäroiden in vorkultivierten Hühnerherzfragmenten und in kultiviertem humanem Endometrium fest.

Die Expression von Connexinen scheinen bei der gezielten Kontrolle von Wachstumsprozessen von entscheidender Bedeutung zu sein. Ein Verlust der Cx-Expression kann zu unkontrolliertem Wachstum führen. Dies ist aus zahlreichen Beispielen der Literatur bekannt.

Ein eindrucksvolles Beispiel für den Zusammenhang zwischen Verlust von zellulärer Kommunikation und Tumorgenese zeigen *in vivo* Versuche an Cx32-defizienten Mäusen. Eine homozygote Mutation des Cx32-Gens, welches in der Leber von Wild-Typ-Mäusen exprimiert wird, führte dazu, daß die Mäuse deutlich mehr spontane und durch Diethylnitrosamin induzierte Lebertumoren entwickelten (Temme et al., 1997). Connexin 32 stellt damit ein Tumorsuppressorgen für Leberkarzinome in Mäusen dar. Auch ein verändertes Connexinexpressionmuster spielt in der Tumorgenese eine Rolle (Holder et al., 1993). Das kleinzellige Bronchialkarzinom z.B. exprimiert Cx26, während normales Lungengewebe Cx43 exprimiert. Aber auch eine unveränderte Connexinexpression, wie beim Prostatakarzinom, ist beschrieben worden. So exprimieren Prostatakarzinome unverändert zum Normalgewebe Cx43 (Wilgenbus et al.1992).

2. Variationen im Connexin-Expressionsmuster während der Plazentation und die Art des Connexin-Typs regulieren die Stärke der Proliferation und Differenzierung

Direkte Zell-Zell-Kommunikation durch Gap-junctions scheinen an der gezielten Kontrolle von Invasion, Migration und Proliferation der Trophoblastzellen sowie ihrer Differenzierung eine wichtige Rolle zu spielen.

Untersuchungen während der Implantation und Plazentaentwicklung der Ratte zeigten eine geordnete Expression von Gap-junction-Kanälen sowohl im Trophoblasten als auch im Endometrium (Winterhager et al., 1993 und 1996). Als Reaktion auf den invadierenden Trophoblasten kommt es bei der Ratte zu einer Cx43-Expression in der gesamten Dezidua und einer auf den durch den Trophoblasten geformten Implantationskammer begrenzten Cx26-Expression im Uterusepithel.

Während der Plazentaentwicklung zeigt die Blastozyste der Ratte zunächst eine Co-Expression von Cx31 und Cx43 auf, die aber mit Beginn der Implantation eine Segregation aufweist (Reuss et al., 1996). Die stark proliferierenden und invasiven Zellen des Ektoplazentarkonus, der vom polaren Trophoblasten gebildet wird, sind durch Cx31-Expression gekennzeichnet, während die Cx43-Expression auf den eigentlichen Embryo beschränkt bleibt. Da Cx31 und Cx43 keine funktionellen Gap-junction-Kanäle ausbilden können (Elfgang et al., 1995), haben sich Embryo und Trophoblast somit kompartimentalisiert. Während der weiteren Entwicklung der Plazenta verlieren die Trophoblasten ihre invasiven Eigenschaften und differenzieren sich zur reifen Plazenta. Dies ist mit einem Wechsel der Expression von Cx31 zu Cx26 im labyrinthären Abschnitt und zu Cx43 in den Spongiotrophoblasten, sowie den Riesenzellen verbunden (Reuss et al., 1996). Die Differenzierung der Trophoblastzellen zu verschiedenen Subpopulationen geht also mit einer Induktion anderer Connexingene einher. An der Maus wurden entsprechende Befunde erhoben (Dahl et al., 1996).

Untersuchungen zur Connexin-Expression der humanen Plazenta zeigten hingegen ein anderes Verteilungsmuster von Connexinen (von Ostau, Dissertation, Universitätsklinikum Essen, 1997, Winterhager et al., 1999). Während der villöse Zytotrophoblast keine Connexin-

Expression aufwies, war eine als extravillöser Zytotrophoblast bezeichnete Zellpopulation durch eine starke Cx40-Expression charakterisiert. Diese, durch eine starke Proliferation gekennzeichnete Zellpopulation, fand sich in der sog. juxtastromalen Region von Zellinseln und Zellsäulen, vorrangig im frühen Entwicklungsstadium der Plazenta.

3. Eine Cx40-Expression geht mit einer verstärkten Proliferation einher und wird in unterschiedlichem Ausmaß bei Chorionkarzinomzellen gefunden

In Untersuchungen zur Connexin-Expression der drei Chorionkarzinomzelllinien BeWo, Jeg-3 und JAr konnte ebenfalls, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, die Expression des Connexin40-Gens nachgewiesen werden (Hellmann et al., 1996).

Da das trophoblastische Ursprungsgewebe der Chorionkarzinomzelllinie BeWo bisher nicht bekannt war, führte die Detektion von Cx40 in den Zellinseln bzw. Zellsäulen der humanen Plazenta zu der Vermutung, daß diese Zellen möglicherweise den Ursprungsort für das Chorionkarzinom darstellten. Einen weiteren Hinweis dafür bietet die Entdeckung, daß in beiden Zelltypen p53 Proteine immunhistochemisch nachweisbar sind, ohne daß eine Mutation vorliegt (Landers et al., 1994 und Marzusch et al., 1995).

Von Ostau konnte außerdem an männlichen Chorionkarzinomen eine Cx40-Expression nachweisen (Dissertation, Universität-Essen, 1998). Die Tatsache, daß das männliche als auch das weibliche Chorionkarzinom zu den am stärksten metastasierenden Tumorarten überhaupt gehört und Cx40 bei der Metastasierung den Aufbau einer homologen wie heterologen direkten Zell-Zell-Kommunikation mit Endothelzellen vermittelt, welche durch Cx37, 40 und 43 charakterisiert sind (El-Sabban et al., 1991 und Bruzzone et al., 1993), sowie die Tatsache, daß die in den Zellinseln und Zellsäulen durch Cx40 ausgestatteten Zellen der humanen Plazenta durch stetige Proliferation auch in der terminal differenzierten Plazenta gekennzeichnet sind, führte zu der Hypothese, daß Cx40 ein Kanal zur Koordination einer verstärkten Proliferation mit folgender Invasion darstellt. Die Rolle von Cx40 sollte in diesen Transfektionsstudien ebenfalls näher untersucht werden.

Warum die juxtastromal gelegenen Zytotrophoblastzellen der Zellinseln und -säulen eine signifikante Cx40-Expression aufweisen, ist bislang jedoch ungeklärt.

Für die Yamasaki-These (1991), daß ein Verlust von Zelladhäsionsmolekülen und Zellkontakten mit für einen Invasivitätsprozeß von Zellen verantwortlich ist, sprechen die Untersuchungsergebnisse, die die Arbeitsgruppe Winterhager et al. (1996) am extravillösen Trophoblasten herausfanden. Während die Zellen des extravillösen Zytotrophoblasten der Haftzotten in das maternale Gewebe, der Dezidua, migrieren - also vom proliferativen zum invasiven Zelltyp übergehen - geht die Cx40-Expression verloren. Bei erneuter Zellaggregation, die im Plazentabett stattfindet, reexprimieren diese invasiven Zytotrophoblasten ihre Cx40-Expression.

Ob die Connexin40-Expression in malignen Trophoblastzellen, die bekanntlich im Gegensatz zu den Trophoblastzellen irreversible invasive Eigenschaften besitzen, eine Funktion hat oder der Cx40-Kanal nur rudimentär in Chorionkarzinomzellen ausgebildet ist, wurde von Hellmann an den Chorionkarzinomzelllinien BeWo, Jeg-3 und JAr untersucht (Hellman et al., 1996). Die untersuchten Zelllinien zeigten ein inhomogenes Expressionsmuster an Cx40 Gap-junction-Kanälen und waren in ihrem Kopplungsvermögen uneinheitlich. Dies wurde durch Lucifer Yellow-Injektion (ein negativ geladener, fluoreszierender und nicht membrangängiger Farbstoff), Kalziumtransfer und biophysikalischen Untersuchungen unter Berücksichtigung der ladungsabhängigen Permeabilität der Cx-Kanäle nachgewiesen.

Drei Befunde konnten abgegrenzt werden: BeWo-Zellen, die eine inhomogene Cx40-Expression zeigten, JAr-Zellen, die Cx40- und Cx43-Kanäle koexprimierten und sich durch gutes Kopplungsvermögen auszeichneten, sowie weitgehend kopplungsdefiziente Jeg-3-Zellen, in denen lediglich geringe Mengen von Cx40-Transkripten nur mit Hilfe der RT-PCR-Methode nachgewiesen werden konnte. Obwohl die Jeg-3-Zelllinie ursprünglich als Subklon von BeWo isoliert wurde, konnte auf Proteinebene kein Cx40 detektiert werden.

Neben der Funktionalität der Kanäle, die Hellmann (Dissertation, 1995) v.a. an Cx40- und Cx43-Kanälen von parentalen BeWos und Transfektanten beleuchtete, führte er auch zellbiologische Untersuchungen durch. Er stellte fest, daß Zellen, die den Cx40-Kanal exprimierten, zwar untereinander gekoppelt sind, sich aber der Kontrolle durch den umliegenden Gewebeverband entziehen. Insbesondere die heterozelluläre Kommunikation, also das Kommunikationsvermögen zu anderen Zellen, ist stark herabgesetzt, was frühere Untersuchungen, die von Bruzzone et al. (1993) und Elfgang et al. (1995) durchgeführt wurden, bestätigt. Hellmann konnte dies an co-kultivierten parentalen BeWo-Zellen (Cx40) und mit Cx43 transfizierten HeLa-Zellen demonstrieren (Hellmann, Dissertation, Universität Essen, 1995).

So könnte die eingeschränkte hetero-zelluläre Kommunikation des Cx40-Kanals auch als Erklärung für die auf den extravillösen Trophoblasten an den Zellinseln und Zellsäulen der humane Plazenta begrenzte Proliferationsmöglichkeit dienen. Diese mögliche *in vivo* Kompartimentalisierung durch Expression von unterschiedlichen Cx-Kanälen in verschiedenen Bereichen eines Gewebes, sollte auch in den Experimenten an Nacktmäusen untersucht werden.

So hätte man von Cx40-transfizierten BeWo-Zellen, die subkutan in die Flanken der Nacktmäuse injiziert worden waren, vermutet, daß sie proliferativere Eigenschaften zeigten als BeWo-Zellen, die mit Cx26 oder Cx43 transfiziert worden waren. Entgegen den Erwartungen konnte jedoch für die BeWo-Zelllinie kein Tumorwachstum beobachtet werden, d.h., daß die BeWo-Zellen im klassischen Sinne keine Tumorzellen darstellen.

Um Rückschlüsse auf Cx-spezifische Auswirkungen von Tumorzellen auf Proliferation und Invasion *in vivo* zu treffen, wären somit weitere Transfektionsexperimente an Nacktmäusen auch mit anderen Chorionkarzinomzelllinien erforderlich.

Eine Reduzierung des Tumorwachstums *in vivo* konnte nach Transfektionen von C6 Gliomazellen mit Cx32 (Bond et al., 1994), SKHep1 Zellen mit Cx32 (Eghbali et al., 1991) und HeLa Zellen mit Cx26 (Mesnil et al., 1995) beobachtet werden.

4. Die exogene Cx-Expression ändert das Proliferationsverhalten der Chorionkarzinomzelllinie BeWo

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluß von exogen exprimierten Connexinen auf Proliferation, Invasion sowie Differenzierung und damit auf die Tumorigenität der Chorionkarzinomzelllinie BeWo untersucht werden.

Dabei wurden verschiedene Connexin-Gene (cDNA-Fragmente von Ratten-Cx26, humanem Cx40 und humanem Cx43) über Expressionsvektoren zusammen mit einem Puromycin-Selektionsvektor mittels Liposomentechnik in die maligne Trophoblastzelllinie BeWo cotransfiziert und die Proliferation *in vitro* mit der Negativkontrolle (den Puromycin-Klonen, welche den Basisvektor ohne Cx-Insert + den Puromycinselektionsvektor enthielten) und der parental BeWo-Zellen verglichen. Unterschiede in der Differenzierung sollten anhand der β -hCG-Hormonproduktion aufgezeigt werden.

BeWo-Zelllinien und auch Connexin-Transfektanten zeigten an Nacktmäusen, wie schon erwähnt, kein tumoröses Wachstum.

Zunächst konnten auf Proliferationsebene Cx-spezifische signifikante Unterschiede in der Zellteilungsrate *in vitro* festgestellt werden.

In der ersten Versuchsreihe zeigten die mit Cx26 und Cx43 transfizierten BeWo-Klone gegenüber den parental Zellen eine deutliche Reduzierung des *in vitro*-Wachstums, während Cx40 transfizierte BeWo-Zellen eine erhöhte Zellteilungsrate aufwiesen.

Damit wichen die Ergebnisse der BeWo-Transfektanten von dem geänderten Proliferationsverhalten transfizierter Jeg-3-Zellen insofern ab, als daß Hellmann in seinen Untersuchungen an mit Cx26, 40 und 43 transfizierten Zellklonen eine allgemeine Reduzierung der Proliferation für alle Transfektanten gegenüber der Kontrolle feststellte (Hellmann et al., 1999). Hellmann et al., (1999), beschrieben Cx26 als den Kanal, der die Zellproliferation am effektivsten hemmte und die Differenzierung induzierte. Cx40-Transfektanten konnten ebenfalls die Zellteilungsrate herabsetzen, wiesen aber geringere β -hCG-Hormonwerte als Differenzierungsmarker auf. Cx43 übte nur einen moderaten Einfluß auf Proliferation und Differenzierung aus.

Kritisch anzumerken ist jedoch, daß Hellmann in früheren Proliferationsuntersuchungen (Dissertation, Universität Essen, 1995) an Jeg-3-Transfektanten ganz andere Ergebnisse erzielte. Dort stellte er für alle Cx43-Transfektanten die deutlichste Reduzierung der Proliferation fest, während Cx26 und Cx40 nur geringe Unterschiede in der Zellteilungsrate zur Ausgangszelllinie zeigte und v.a. den geringen Einfluß der starken und homogenen Cx40-Expression herausstellte. Für Zellen, die mit Cx43 transfiziert worden waren, vermutete Hellmann aufgrund von RNA-Analysen die Induktion des endogenen Cx43 Gens, welches zusätzlich einen auf Cx43-Kanäle beschränkten Austausch wachstums-inhibierender Stoffe verstärken könnte.

Ein solches Hybridisierungssignal konnte ich in den RNA-Analysen an Cx43-Transfektanten jedoch nicht bestätigen.

Transfektionsexperimente an Jeg-3-Zellen (Hellmann et al., 1998) zeigen, daß man kritisch mit der Frage umgehen muß, ob es sich bei der Wachstumsinhibition nach Cx-Transfektion tatsächlich um einen Effekt handelt, der durch das exprimierte Cx-Gen hervorgerufen wird, oder ob vielmehr die Transfektion an sich und mit ihr einhergehende exogene Einflüsse, wie der Puromycin-Selektionsdruck, entscheidend das Wachstumsverhalten bestimmen.

Durch vergleichende Transfektionsexperimente mit verschiedenen Cx-Kanälen und an verschiedenen Zelllinien sollte geklärt werden, ob ein ganz bestimmter Cx-Typ zur Proliferationshemmung führt oder ob dies von der Zelle abhängt, also die Wachstumsinhibition ein kanalspezifisches oder ein zellspezifisches Phänomen darstellt.

Mesnil (1995) hat in seinen Transfektionsstudien an HeLa-Zellen festgestellt, daß nur die exogene Expression von Cx26, nicht aber die von Cx40 und Cx43, eine wirksame hemmende Wachstumskontrolle an HeLa-Zellen *in vitro* und *in vivo* ausübt, obwohl das Ausmaß der direkten Zell-Zell-Kommunikation, durch Transfer von Lucifer Yellow nachgewiesen, annähernd gleich war. Mesnils Ergebnis spricht für die These, daß entsprechend der variablen Connexin-Ausstattung in verschiedenen Geweben, die Connexine zellspezifische und damit vom jeweiligen Zellverband abhängige Aufgaben besitzen.

Ergebnisse von anderen Laborinstituten bestätigten die Auffassung, daß die Connexinspezifische Funktion in einem Gewebe nicht durch Transfektion dieses Connexins auf andere Gewebe übertragbar ist (Dermietzel et al., 1993).

Vielmehr scheint die ursprüngliche Connexinexpression, wie sie unter normalen, physiologischen Bedingungen existiert, die entscheidende Rolle in der Tumorsuppression zu spielen. So konnte gezeigt werden, daß reinduzierte direkte Zell-Zell-Kommunikation - vermittelt durch Transfektion von Cx43 - mit einem Verlust von Tumorigenität von zuvor chemisch transformierten Mäuse-Fibroblasten und einer Abnahme der Tumorigenität von Ratten-Gliazellen verbunden ist. Sowohl Mäuse-Fibroblasten als auch Ratten-Gliazellen exprimieren unter physiologischen Umständen Cx43 (Naus et al., 1992; Rose et al., 1993).

Des weiteren wurde eine Reduzierung der Wachstumsraten von hepatischen SKHep1-Tumorzellen *in vitro* nach Transfektion von Cx32 erzielt, welches physiologisch das dominierende Connexin in Hepatozyten ist (Eghbali et al., 1991).

Mesnil (1995) erklärte die selektive Cx26 vermittelte Proliferationshemmung mit der physiologisch hohen Transkriptionsrate von Cx26 in Cervixzellen der Ratte, jenem Gewebe, aus dem HeLa-Zellen ursprünglich hervorgegangen sind.

Diese Theorie läßt sich auf die in der vorliegenden Arbeit dargestellte erhöhte Proliferationsrate von Cx40-transfizierten BeWo-Zellen anwenden.

Als Ursprungsgewebe dieser Chorionkarzinomzelllinie wird, wie erwähnt, der extravillöse Trophoblast diskutiert, der sich durch Cx40-Expression und starke Proliferation auszeichnet (von Ostau, 1997). Eine Korrelation von Cx40-Expression und starker Zellteilungsrate bestätigt sich durch meine Transfektionsstudie, zumal nach immunhistochemischem Verlust der exogenen Cx40-Expression im Wiederholungsansatz die Proliferation eindeutig zurückging. Selbst nach dem exogenen Cx40-Verlust proliferierte derjenige Klon stärker, der eine höhere endogene Cx40-Transkriptionsrate besaß.

Die Expression von Cx40 scheint also ein Charakteristikum von proliferierenden pseudo-malignen (extravillöser Trophoblast der humanen Plazenta) wie von proliferierenden malignen Trophoblastzellen zu sein.

Für diese Aussage spricht ferner die Detektion von Cx40 im männlichen, proliferierenden Chorionkarzinom (von Ostau, 1997) sowie der Nachweis der stärksten Ki-67-Expression, in jenen Arealen der humanen Plazenta und des männlichen Chorionkarzinoms, die sich durch eine Cx40-Expression auszeichneten. Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, der immunhistochemisch ein Antigen der S-Phase markiert.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß es bei der Expression von Cx40 um einen Kanaltyp handelt, der entgegen mancher bisheriger Meinung nicht etwa die Proliferation hemmt, sondern für Trophoblastzellen und ihrer malignen Variante, dem Chorionkarzinom, eine verstärkte Zellteilungsrate induziert.

In diesem Zusammenhang ist das hohe Metastasierungspotential von Chorionkarzinomen in Zusammenhang mit der Fähigkeit zur hetero-zellulären Kommunikation zu Endothelzellen interessant. Endothelzellen sind durch Expression von Cx37, 40 und 43 charakterisiert und Cx40 am Aufbau von heterologen Kanälen mit Cx37 (Bruzzone et al., 1993) entscheidend beteiligt. Es wird spekuliert, daß die Cx40 vermittelte direkte Zell-Zell-Kommunikation zu Endothelzellen für die starke Intravasation der Chorionkarzinomzellen verantwortlich ist.

Cx40 als Tumorsuppressorgen zu sehen, ist in dieser Hinsicht somit sehr fragwürdig. Drei Feststellungen sprechen dagegen:

1. Die mit Cx40 assoziierte erhöhte Proliferationsaktivität
2. Die heterotypische Kommunikation des Cx40-Kanals. Die Zellen sind zwar untereinander gekoppelt, entziehen sich allerdings der Kontrolle durch den umliegenden Gewebeverband (Bruzzone, 1993)
3. Der einzige Cx-Typ, der zu funktionellen Kanälen mit Cx40 führt, ist das Cx37. Dieser heterologe Cx40/Cx43-Kanal ist möglicherweise an der Kopplung von malignen Trophoblastzellen an Endothelzellen beteiligt und kann so die Intravasation mit der Folge der Metastasierung begünstigen (Grümmer, persönliche Mitteilung).

Trotz des Einflusses von Puromycin auf das Proliferationsverhalten der transfizierten BeWo-Zellen, läßt sich in dieser Arbeit doch auch noch ein unterschiedlicher Einfluß der Kanäle auf die Proliferation feststellen.

Connexin26 und Connexin43 könnte nach den hier vorliegenden Ergebnissen, im Gegensatz zu Connexin40, die Tumorigenität von BeWo-Zellen herabsetzen. Die exogene Expression von Cx26 und Cx43 geht mit proliferationsinhibierenden Effekten einher.

Diese Beobachtungen sprechen für die Theorie einer kanalspezifischen Regulation von Tumorigenität, denn Cx26 und Cx43 sind für BeWo-Zellen nicht zellspezifisch, so daß diese Kanäle als Tumorsuppressorgene fungieren könnten, wie von Lee et al. (1992) in anderen Arbeiten postuliert.

Wie diese Wachstumskontrolle durch solche Connexin-Kanäle vermittelt werden könnte, ist Gegenstand der Forschung. Wachstumsregulierende Signale, die durch Gap-junction-Kanäle transferiert werden, werden schon seit langer Zeit diskutiert (Loewenstein, 1988). Mehr Einblick in die molekularen Mechanismen, die dieses Phänomen charakterisieren, konnte Chen et al. (1995) durch seine Untersuchungen mit Ratten-Cx43 transfizierten TRMP-Zellen geben. Cx43 führte durch Verdopplung der G1- und S-Phasendauer zu einer Wachstumsinhibition. Diese Effekte waren mit einer reduzierten Expression spezifischer, den Zellzyklus regulierender Gene verknüpft, wie Cyclin A, D1, D2 sowie CDK5 und CDK6.

Daß die in dieser Arbeit festgestellte Proliferationshemmung von Cx26- und Cx43-Transfektanten eindeutig mit der Expression von Cx26 und Cx43 korreliert ist, zeigen die Ergebnisse des Wiederholungsansatzes. Cx-Transfektanten, bei denen immunhistochemisch ein Cx-Verlust festgestellt worden war, zeigten eine höhere Zellteilungsrate.

Auch wenn immunhistochemisch kein Nachweis von exogen eingebrachten Connexinen mehr möglich war, schien eine gewisse Zell-Zell-Kommunikation noch vorhanden, solange auf mRNA-Ebene Mengen von exogenen Cx-Transkripten feststellbar waren. So konnten Unterschiede in der Proliferation an immunhistochemisch negativen Cx26-Transfektanten mit dem Grad zu detektierender Cx26-Transkripte korreliert werden. Dies konnte auch Mesnil (1995) in seiner Studie von Cx26-transfizierten HeLa-Zellen bestätigen, der feststellte, daß Transfektanten mit hoher Cx26-Transkriptionsrate tumorsuppressive Eigenschaften besaßen, während Transfektanten mit niedriger Cx26 -Transkriptionsrate tumorbegünstigend wirkten. Mesnil führte die Unterschiede in der Tumorigenität - obwohl er für alle Cx26-Transfektanten ein ähnliches Ausmaß von direkter Zell-Zell-Kommunikation eruierte (LY) - auch auf die unterschiedliche Lokalisation von Cx26-Proteinen in der Zelle zurück, z. B. wenn diese häufig intrazellulär nachzuweisen waren.

5. Einfluß der endogenen Cx40-Expression auf das Proliferationsverhalten nach exogenem Cx-Verlust

Im Gegensatz zu HeLa-Zellen, die lange als kopplungsdefizient galten, bevor die Expression geringer Mengen von Connexin45 nachgewiesen werden konnte (Hellmann, Dissertation 1995), muß bei der Proliferationsbewertung von immunhistochemisch negativen Cx26- und Cx43-Transfektanten die Rolle der endogenen Cx40-Expression von BeWo-Zellen berücksichtigt werden, da der Cx40-Kanal - wie sich in den Untersuchungen zeigte - mit erhöhter Proliferation assoziiert ist.

Um die Frage zu beantworten, ob bei immunhistochemisch negativen Cx-Transfektanten eine erhöhte Proliferation durch exogenen Cx-Verlust und niedriger Cx-Transkriptionsrate auf mRNA-Ebene oder durch eine starke endogene Cx40-Expression verursacht wird, wurden die Membranen mit der RNA aller Cx26- und Cx43-Transfektanten mit einer Cx40-cDNA-Sonde rehybridisiert.

Die Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß bei gleicher endogener Cx40-Expression, wie sie z.B. bei den Cx26-Transfektanten bestand, Unterschiede in der Proliferation eindeutig auf die Transkriptionsrate des exogen eingebrachten Connexins zurückzuführen sind. In den Fällen, in denen aber sowohl unterschiedliche Transkriptionsraten des exogenen Connexins als auch unterschiedliche Mengen von endogenen Cx40-Transkripten zum Nachweis kommen, muß man beide Transkriptionsraten zur Beurteilung der Proliferation vergleichen. So konnte am Proliferationsverhalten der immunhistochemisch negativen Cx43-Transfektanten pPH17(34) und pPH17(19) bei verschiedenen Puromycinkonzentrationen die geringere Zellteilungsrate von pPH17(19) mit einer höheren mRNA-Transkriptionsrate für Cx43 begründet werden, während bei dem Klon pPH17(34) eine stärkere endogene Cx40-Transkriptionsrate vorherrschend war.

Die hier durchgeführten Transfektionsstudien zeigen, wie differenziert man das Ausmaß endogener und exogener Transkription und Proteinexpression von Connexinen und ihren Einfluß auf die Proliferation sehen muß, wenn - wie in diesem Falle - die Cx-Transfektanten nur vorübergehend die exogen eingebrachten Connexine auf Proteinebene exprimieren und nach einiger Zeit in Kultur nicht mehr nachweisbar sind.

6. Einfluß des Selektionsdruckes von Puromycin auf die Proliferation und Differenzierung

Ein ganz entscheidender Faktor, der bei der Bewertung der Proliferation und v.a. der Differenzierung der Zellen berücksichtigt werden muß, ist die Rolle des Puromycins.

Es fällt auf, daß die Puromycin-Klone (Basisvektor ohne Cx-Insert + Puromycinselektionsvektor) in allen Versuchsreihen die geringsten Proliferationsraten erzielten, obwohl man ihre Zellteilungsrate im Bereich der parentalen BeWo-Zellen erwartet hätte, da beide Zellreihen nicht durch die postulierte Wirkung des exogen eingebrachten Connexins beeinflusst werden.

Dieser Vergleich zeigt, daß Puromycin offensichtlich einen supprimierenden Effekt auf die Proliferation transfizierter Zellen hat und nach den Proliferationskurven von Cx-Klonen und Puro-Klonen zu urteilen, scheint die stärkste Proliferationshemmung nicht etwa durch die Expression von Connexinen, sondern allein durch die Puromycineinwirkung auf die Zellen verursacht zu sein. Die Untersuchung aller Klone auf die intakte Funktionsfähigkeit des Puromycin-Resistenzgens brachte schließlich auch die Erkenntnis, daß die Klone nach einiger Zeit in Kultur das *pac*-Gen (= Puromycin-N-acetyltransferase-Gen) im Puromycin-Selektionsvektor pBEH-*pac*18 nicht mehr transkribieren und offensichtlich das auf sie einwirkende Puromycin auch ohne das inaktivierende Enzym subtoxisch tolerierten.

Puromycin ist ein Nucleosid-Antibiotikum aus *Streptomyces alboniger*, welches die Proteinsynthese an den Ribosomen sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten hemmt. Es stellt ein Analogon der endständigen Aminoacyladenosingruppe einer tRNA dar und verursacht einen vorzeitigen Kettenabbruch, da es den Eintritt der Aminoacyl-tRNA in die A-(Aminoacyl-)Stelle des Ribosoms blockiert. Seine Aminogruppe geht in einer von der Peptidyltransferase katalysierten Reaktion mit der Carboxylgruppe der wachsenden

Peptidkette eine Peptidbindung ein. Das Produkt ist ein Peptid mit einem kovalent gebundenen Puromycinrest. Anschließend dissoziiert die unvollständige Polypeptidkette vom Ribosom ab (Stryer, 1994).

Es ist aber auch nicht von der Hand zu weisen, daß die Connexine durchaus an den erwähnten Effekten auf die Proliferation der BeWo-Zellen nach Transfektion beteiligt sind. Dies ergibt sich sowohl durch Vergleich der drei verschiedenen Cx-Klonen untereinander als auch durch die veränderten Proliferationsverhältnisse nach Cx-Verlust. Nur sind Proliferationsunterschiede zwischen Connexin-Transfektant und parentaler BeWo-Zelle nicht allein aufgrund des veränderten Cx-Musters zurückzuführen, sondern man muß die Rolle des Puromycins und seine Wirkung berücksichtigen.

Streng genommen ist somit ein Vergleich von BeWo-Transfektant und parentaler BeWo-Zelle nicht zulässig und es empfiehlt sich, Proliferation und Differenzierung lediglich zwischen Cx-Transfektant und seinem Puromycin-Klon zu vergleichen, da nur diese beiden Zellgruppen dem Puromycin ausgesetzt sind. Dies wird auch bei der Analyse der β -hCG-Werte deutlich, einem Plazentahormon, welches als Marker der Differenzierung anzusehen ist und sowohl von Trophoblasten als auch von Chorionkarzinomzellen sezerniert wird (Kliman et al., 1986 und Kohler et al., 1971). Entsprechende Untersuchungen an Cx-Klonen von Jeg-3-Zellen (Hellmann et al., 1998, in press) postulierten, daß Connexine durch Kopplung und direkter Zell-Zell-Kommunikation zu höherer Differenzierung führen. In den durchgeführten Untersuchungen wiesen jedoch nicht die Cx-Klonen die höchsten Werte von β -hCG auf, sondern paradoxerweise die nicht-transfizierten parental BeWo-Zellen. Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß Puromycin auch eine Differenzierung der BeWo-Zellen unterdrückt.

Daß die Puromycin-Dosis einen möglichen Toxizitätsfaktor darstellt, konnte bereits an Vorversuchen mit Cx26-Klonen festgestellt werden, die bei einer höheren Dosis kultiviert worden waren. Die Kulturen waren nach wenigen Passagen durch Plaquebildung und Degeneration gekennzeichnet. Eine Reduzierung des Puromycin-Selektionsdruckes auf 0,75 mg/ml führte zum einen zu einer höheren Ausbeute an Klonen und zum anderen zu weniger Komplikationen während der Kultivierung.

7. Eine lange Kulturdauer begünstigt durch Selektion Klone, die ohne Expression des Resistenzgens den Selektionsdruck von Puromycin tolerieren

Interpretiert man die mRNA-Analyse des Puromycin-Resistenzgens dahingehend, daß die Transfektanten im Laufe ihrer Kultivierung die Transkription des Resistenzgens herunterregulieren bzw. gänzlich verlieren, wird offensichtlich, warum Puromycin die erwähnten supprimierenden Effekte auf Proliferation und Differenzierung ausübt. Es wird nicht in ausreichendem Maße die Puromycin-N-acetyltransferase (pac) exprimiert, welche das Puromycin in seiner Wirkung inhibiert.

Der toxische Einfluß des Puromycins in Form der Proteinbiosynthesehemmung könnte damit eine entscheidende Ursache dafür sein, daß die Cx-Transfektanten ihre exogene Expression

im Laufe der Kultivierung verlieren. Durch das Puromycin wird die Proteinsynthese an den Ribosomen, die Translation, gehemmt, während die Transkription unberührt bleibt (Stryer, 1994). Für diese These spricht der immunhistochemisch festgestellte Cx-Verlust auf Proteinebene, während mRNA-Analysen noch deutliche Transkriptionsraten zeigten. Eine Mutation des Puromycin-Resistenzgens als mögliche Ursache der mangelnden pac-Expression ist nicht haltbar, da man bei fehlerfreier Hybridisierung der mRNA dieses im Autoradiogramm gesehen hätte. Zu hinterfragen ist ferner, warum sich die Proteinbiosynthesehemmung nicht letal auf Lebens- und Wachstumsvorgänge der transfizierten BeWo-Zelle ausgewirkt hat, denn ein vermehrtes signifikantes Absterben von Zellen bei der Endkonzentration von 0,75 mg/ml Puromycin im Medium war nicht festzustellen.

Diese Beobachtungen könnte man damit erklären, daß einzelne transfizierte BeWo-Zellen durch Mutationen oder durch Adaptionen im Laufe der Kultivierung einen Selektionsvorteil erhielten, der bei niedrigerem Puromycinselektionsdruck dazu führte, daß durch klonale Selektion diejenigen Zellen bevorteilt wurden, welche die Puromycinkonzentration auch ohne einer zwangsweisen Expression des Puromycin-Resistenzgens tolerierten.

Ist zu Beginn der Selektion mit stufenweiser Erhöhung der Puromycin-Konzentration nach stabiler Transfektion noch von einer Aktivität des Puromycin-Resistenzgens auszugehen, welche schließlich auch dazu führte, daß homogen exprimierende Cx-Transfektanten isoliert werden konnten, so scheint zum Zeitpunkt der mRNA-Extraktion der die Klone begünstigende Selektionsvorteil bereits vollzogen gewesen zu sein. Die mRNA der ersten Versuchsreihe wurde etwa 8-10 Wochen nach erfolgter Transfektion isoliert.

Die sich auf diese Weise entwickelte Toleranz gegenüber dem Puromycin würde auch erklären, warum letztendlich die Proteinbiosynthesehemmung sich nicht einschneidend auf die Homeostase und Aufrechterhaltung essentieller Stoffwechselprozesse in der Zelle ausgewirkt hat.

Ein anderer Gesichtspunkt, der die Toleranz der Zellklone gegenüber dem Puromycins erklären könnte, ist das Phänomen der primären Resistenz einiger Tumore gegen verfügbare Noxen, z.B. im Rahmen einer Chemotherapie (Borst, P., 1999). Diese Tumoren produzieren zelluläre Marker, meist Glykoproteine, die in der Literatur für ein Nichtansprechen einer Chemotherapie bei der Behandlung von malignen Tumoren verantwortlich gemacht werden. Solche Marker werden von sog. „Multidrogenresistenzgenen“ kodiert, die entweder endogen oder durch Kontakt mit Noxen aktiviert werden (Ramachandran et al., 1999).

Zu beachten ist ferner, daß im Grunde zu keinem Zeitpunkt ein Selektionsdruck auf die Expression der Connexine bestand, sondern lediglich zu Beginn der Transfektion auf Integration der Vektoren ins Genom - ein wesentlicher Schwachpunkt dieser Methode beim Transfer und der Klonierung von Genen. Hier wäre zukünftig für weitere Transfektionsexperimente unter Umständen ein Expressionsvektor, der beide Gene, sowohl für den Selektionsmarker als auch für das zu exprimierende Connexin trägt, von effizienterem Nutzen.

Die exogene Expression der Connexine könnte, vor dem Hintergrund der Co-Transfektion aus gesehen, d.h. der Transfektion zweier Plasmidvektoren, bei der das Resistenz vermittelnde Gen nicht auf dem gleichen Vektor wie die Cx-Expressionseinheit lokalisiert ist, durch

mangelnden oder fehlenden Selektionsdruck herunterreguliert worden sein, ohne daß ihre Proteinbiosynthese wirklich durch das Puromycin gehemmt wurde.

Die gewonnene Toleranz gegenüber dem Puromycin bei einer niedrigeren Dosis reichte somit aus, die BeWo-Transfektanten weiter in Kultur zu halten. Trotzdem konnten sich von der Puromycin-Dosis abhängige toxische bzw. subtoxische Einwirkungen auf die transfizierten BeWo-Zellen feststellen lassen.

8. Die β -hCG-Hormonproduktion kann als Marker der Toxizität für die Zellklone herangezogen werden und Cx-Kanäle helfen bei der Detoxifizierung

Der Einfluß von verschiedenen Puromycin-Dosen auf Proliferation und β -hCG-Produktion wurde an zwei immunhistochemisch negativen Cx43-Transfektanten und am Puro-Klon mit dem transfizierten Leervektor pSG-5(1) untersucht. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen hohen Puromycin-Dosen und daraus resultierender geringerer Zellteilungsrate, konnte bei den Cx-Transfektanten jedoch nicht festgestellt werden. Anders die Wachstumskurven des Puro-Klons: Hier konnte eine von der Puromycin-Dosis abhängige Zellteilungsrate aufgezeigt werden. Je höher die Puromycin-Konzentration im Medium war, desto geringer die Proliferationsgeschwindigkeit. Die höchste Zellteilungsrate wies die von Puromycin unbeeinflusste parentale BeWo-Kontrolle auf.

Noch eindrucksvoller stellte sich der Zusammenhang für die β -hCG-Hormonproduktion dar. Die β -hCG-Hormonwerte korrelierten eindeutig mit der zugeführten Puromycin-Dosis im Medium, unabhängig davon, ob es sich um die Cx-Transfektanten oder die Puro-Klone gehandelt hat. Die β -hCG-Werte sanken mit steigendem Puromycin-Selektionsdruck.

Damit kann man die β -hCG-Produktion in diesen Versuchsreihen nicht als Differenzierungsmarker ansehen, sondern vielmehr als Marker der auf die Zellklone einwirkenden Toxizität.

Die β -hCG-Werte spiegeln offensichtlich wider, wie stark Puromycin auf die Transfektanten einwirkt. Cx-Kanäle scheinen auch dabei offensichtlich eine entscheidende Rolle zu spielen.

Es fällt auf, daß in den Versuchsreihen der Puro-Klon pSG-5(1) gegenüber den Cx40- und Cx43-Transfektanten durchweg die niedrigsten β -hCG-Werte aufwies. Die Cx-Transfektanten konnten scheinbar mit dem Puromycin besser umgehen, solange sie durch Cx-Kanäle in Verbindung standen.

Auch wenn immunhistochemisch kein Cx-Protein mehr detektierbar war, schien dieser Effekt Bestand zu haben, solange auf mRNA-Ebene eine erhöhte Transkriptionsrate des betreffenden Connexins nachgewiesen werden konnte und trotzdem ein geringer Einbau in die Zellmembran stattfand, der lediglich immunhistochemisch nicht mehr feststellbar war. Schon Hellmann stellte in seinen physiologischen Experimenten fest, daß der immunhistochemische Cx-Nachweis nicht sensitiv genug ist, um die Kommunikationsleistungen einer Zelle zu erfassen (Hellmann, Dissertation 1995).

Für diese Theorie sprechen insbesondere die β -hCG-Werte der Cx43-Transfektanten des Wiederholungsansatzes. Derjenige Transfektant, bei dem immunhistochemisch noch Cx43 detektierbar war, hatte die höchsten Werte. Es folgten abhängig von der Transkriptionsrate die Werte der anderen beiden Transfektanten. Bei den Cx40-Transfektanten war ebenfalls der höhere Grad der endogenen Cx40-Transkriptionsrate entscheidend.

Der Puro-Klon mit dem Leervektor pSG-5(1) wies zum Vergleich nur eine schwache endogene Cx40-Transkription auf. Die höheren Werte des Puro-Klons mit dem Sport(3)-Leervektor ließen sich dagegen mit der stärkeren endogenen Cx40-mRNA-Bande der mRNA-Analyse erklären.

Connexine verhelfen augenscheinlich zu einer Detoxifizierung. Möglicherweise werden über die Cx-Kanäle Puromycin-inaktivierende Substanzen ausgetauscht. Der Austausch von zytotoxischen Molekülen bzw. therapeutischen Agentien via Gap-junctions wurde in Versuchen zur Gentherapie an Krebszellen beobachtet, die mit dem Herpes Simplex Virus Tymidin-Kinase-Gen (HSV-tk) transfiziert worden waren (Hamel et al., 1996 und Mesnil et al., 1996). Die Expression dieses Enzyms ist dafür verantwortlich, daß Ganciclovir C (ein Virostatikum, welches ein nichttoxisches Prodrug darstellt) - wenn man dieses den Tumorzellen zuführt - phosphoryliert wird und dadurch in hochtoxische Metabolite überführt wird, die den Zelltod der transfizierten Tu-Zellen vermitteln. Die Forschergruppen fanden heraus, daß Zellen, die nicht mit dem HSV-tk-Gen transfiziert worden waren, aber in unmittelbarer Nachbarschaft dieser transfizierten, HSV-tk-exprimierenden Zellen lagen, nach Behandlung mit Ganciclovir ebenso abstarben. Diese Beobachtung wurde "Bystander Effekt" genannt.

Dieser "Bystander Effekt" wurde wiederholt von zahlreichen Laboratorien mit der Connexin-Expression und Zell-Zell-Kommunikation via Gap-junctions erklärt (Fick et al., 1995 und Vrionis et al., 1997). Es konnte ein Transfer der toxischen Produkte von Ganciclovir von HSV-tk-positiven via Gap-junctions in tk-negative Tu-Zellen nachgewiesen werden.

Damit können therapeutische Agentien, wie in meiner Versuchsreihe vermutlich Puromycin-detoxifizierende Moleküle, durch Diffusion über Gap-junction-Kanäle in ihrer Wirkung entscheidend verstärkt werden.

Dieses Phänomen würde auch erklären, warum die Puromycin-Klone die niedrigsten Wachstumsraten aufwiesen. Ihnen standen nur die endogenen Cx-Kanäle zur Verfügung, die jedoch die Rolle der Detoxifizierung des Puromycins nicht in dem Maße ausüben konnten wie die Cx-Transfektanten, die zusätzlich exogene Cx-Kanäle besitzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen damit die Hypothese, daß Gap-junctions wesentlich an der Homeostase von Geweben beteiligt sind und protektive Effekte, besonders nach toxischer Exposition, ausüben.

9. Schlußfolgerungen und Ausblick für Transfektionsexperimente

Die Transfektionsexperimente mit verschiedenen Connexinen in der Chorionkarzinomzelllinie BeWo haben gezeigt, wie komplex man *in-vitro*-Versuche zur Bestimmung von Proliferation

und Differenzierung und die Rolle von Connexin-Kanälen bei der Tumorsuppression sehen muß, wenn man diese exogen in Zellen einbringt.

Proliferationshemmung und Differenzierung allein auf die Wirkung exogener Connexin-Expression *in vitro* zurückzuführen, ist als kritisch zu bewerten.

Man muß nicht nur berücksichtigen, daß Transfektionsexperimente spezifische Klone selektieren, in denen die Connexin-Gene willkürlich ins Genom eingebaut und i.d.R. durch einen viralen Gen-Promotor abgelesen werden, sondern auch, daß Selektionsmarker, wie in meinem Falle das Puromycin, einen wesentlichen Einfluß auf die Zelle ausüben und Proliferation sowie Differenzierung inhibieren können.

Es stellt sich die Frage, ob Transfektionsexperimente an Zelllinien *in vitro* ein geeignetes Modell zur Beurteilung einer Wachstumsinhibition durch Connexine darstellen und damit ein approbates mögliches Verfahren eines gezielten und dauerhaften Gentransfers in eukaryotische Zellen sein kann.

In den durchgeführten Transfektionsstudien hat sich gezeigt, daß mit Hilfe der Co-Transfektion zwar die Integration von Genen über Plasmide als Vektoren erfolgreich war und diese in etwa einem Drittel der Fälle zu homogen exprimierenden Transfektanten führte, die Expression der transfizierten Gene allerdings nicht dauerhaft war. Neben dem Risiko der unberechenbaren, willkürlichen Integration der transfizierten Gene ins Genom und damit der Gefahr von Beschädigungen wichtiger Gensequenzen, erwies sich als entscheidender Unsicherheitsfaktor in dieser Methode der Selektionsdruck. Dieser besteht bei der Co-Transfektion im Grunde nach Zugabe des entsprechenden Antibiotikums lediglich auf Expression des Resistenzgens, nicht aber auf die Expression der eigentlich erwünschten Cx-Gene. Ein zu hoher Selektionsdruck aber kann zu einem Überwiegen des selektionierenden Antibiotikums und damit zu toxischen Effekten führen, wenn die Zelle eine adäquate Transkription des Resistenzgens nicht mehr bewerkstelligen kann. Ein zu niedriger Selektionsdruck kann dazu führen, daß Zellen durch Mutation bzw. Adaption eine Toleranz gegenüber dem niedrig dosierten Antibiotikum entwickeln. Dieser niedrige Selektionsdruck führt unter der Inkaufnahme möglicher zelltoxischer Einwirkungen des verwendeten Antibiotikums zu einer stabileren und effektiveren Proteinbiosynthese der Zelle, da sie nun auf die Expression nicht-essentieller Gene, die in den Expressionsvektoren lokalisiert sind, verzichten kann. Die entsprechenden Gene - in diesen Untersuchungen das Puromycin-Resistenzgen - werden inaktiviert oder gehen möglicherweise gar verloren.

Dieses Phänomen ist aus der Literatur bekannt. Schmidt-Kastner et al., (1996), konnten an embryonalen Karzinomzellen ebenfalls feststellen, daß nach effizienter, stabiler Transfektion klonierter DNA eine starke Tendenz zum Verlust der Expression dieser transfizierten Gene besteht und der Verlust der Expression sehr rasch über wenige Generationen vollzogen wird, wenn der Selektionsdruck reduziert wird.

Um die für den Expressionsverlust verantwortlichen Mechanismen zu untersuchen, co-transfizierte die Arbeitsgruppe embryonale Karzinomzellen (P19 EC Zellen) mit zwei Plasmiden. In einem Plasmid war ein Gen integriert, welches die Beta-Galaktosidase von *E. coli* kodierte, das andere Plasmid trug ein Puromycin-Resistenzgen. Neben exprimierenden Zellen gab es auch Zellen, die das Beta-Galaktosidase-Gen und das Resistenzgen nach einigen

Subkulturen nicht exprimierten. Weitergehende Untersuchungen ergaben, daß man unter diesen zwei Klassen unterscheiden konnte. Die einen hatten die transfizierten Gene verloren, die anderen hatten sie unter Beibehaltung der Gensequenzen inaktiviert. Letzteres wurde darauf zurückgeführt, daß transfizierte DNA im Genom somatischer Zellen linear hintereinander angeordnet ("in tandem") integriert wird. Diese in mehreren Kopien vorliegende Anordnung innerhalb eines Genoms nach Transfektion ist sehr instabil. Es wird postuliert, daß derartige Sequenzen als Ziele zur Inaktivierung oder zur Neuordnung im Genom erkannt werden. Hohe Mutationsraten und keine oder nur geringe Expressionsraten sind die Folge.

Eine weitere Form der Gen-Inaktivierung, die in der Literatur diskutiert wird, ist die DNA-Methylierung. Sie wurde für eine Vielzahl von Genen beschrieben, insbesondere nach Transfektion, Mikroinjektion und zellfreien Transkriptionsexperimenten.

In eukaryotischen Zellen führt die Methylierung von Cytosinen in spezifischen CpG Dinukleotiden zu einer Inhibition oder Inaktivierung des Promotors, was eine Repression der Transkription verursacht (Razin und Cedar, 1991).

Drei Mechanismen der Transkriptionshemmung und damit der Genexpression aufgrund DNA-Methylierung werden diskutiert:

Zum einen wird durch Methylierung von Cytosinen in bestimmten CpG-Dinukleotiden der Promotorregion eines Gens die Bindung einiger essentieller Transkriptionsfaktoren verhindert und so die Transkription reduziert, zum anderen gibt es Proteine, die kompetitiv an methylierte DNA-Sequenzen binden und so eine Bindung von Transkriptionsfaktoren hemmen und schließlich kann bei einigen Genen die Methylierung zu einer Formation von inaktiven Chromatinstrukturen führen, welche eine effiziente Transkription inhibieren (Comb und Goodman, 1990; Meehan et al., 1992; Graessmann, 1993).

Welche Rolle die Art des Promotors bei der DNA-Methylierung spielt, wurde von Bryans et al.(1992) am SV40 early Promotor analysiert, der in den hier durchgeführten Transfektions-experimenten ebenfalls Bestandteil der verwendeten Vektoren war.

Wird der SV40 early Promotor innerhalb seines natürlichen viralen Genoms methyliert, so konnten keine inhibitorischen Effekte auf die Gen-Expression erzielt werden, wenn die virale DNA in Zellen überführt wurde. Die wenigen CpG im SV40-Genom werden normalerweise *in vivo* nicht methyliert. Bryans et al. (1992) konnten jedoch nachweisen, daß eine Methylierung eine Inhibition der Transkription verursacht, wenn der SV40 early Promotor in ein Plasmid integriert wurde. Da die Inhibition mit dem Ausmaß der Anwesenheit von Methylcytosinen anstieg, wurden methylierte CpG-Sequenzen im Vektor für diese Hemmung verantwortlich gemacht, welche zu einer Formation inaktiver Chromatin-Strukturen führten.

Diese Erkenntnis bedeutet, daß ein Vektor, der reich an CpG-Sequenzen ist, eine Expression transfizierter Gene unterdrücken kann. Somit könnte möglicherweise die Inaktivierung der Transkription des Puromycin-Resistenzgens und der Cx-Gene auf CpG-reiche DNA-Regionen in den verwendeten Vektoren mit nachfolgender Methylierung zurückzuführen sein.

Es gibt Untersuchungsergebnisse, die zeigen, daß CpG-DNA-Regionen in transformierten Zellen sukzessive methyliert wurden (Antequera, 1990). Die Autoren ziehen daraus die Schlußfolgerung, daß ein Gen-Transfer, wenn dieser zufällig ins Genom erfolgt, wirkungslos hinsichtlich der Expression des Gens bleibt, wenn das Gen in G- und C-reiche Umgebung integriert wird.

Die aufgeführten Beispiele zeigen, daß ein Gentransfer mittels Transfektion problematisch ist. Gerade dort, wo eine dauerhafte Integration und Expression erwünscht wäre, müßten sicherere und effizientere Methoden etabliert werden.

Eine andere Methode der Wahl für eine Klonierung von Genen in *E. coli* ist die Verwendung von Bakteriophagen als Vektor. Wie das Plasmid zeichnet sich der Bakteriophage dadurch aus, sich unabhängig vom Genom der Bakterienzelle, d. h. autonom zu vermehren. Im Gegensatz zu den Plasmidvektoren, die durch physikalische oder chemische Methoden in die *E. coli*-Zelle eingeschleust wird, dringt ein einzelner Bakteriophage, wie z. B. Lambda, durch Infektion einer Bakterienzelle in diese ein, vermehrt sich dort und infiziert auch die umliegenden *E. coli*-Zellen, was nach Lysierung der Bakterienzellen zur Bildung sog. Plaques in einem Bakterienrasen führt.

In die Bakteriophagenmoleküle können nun fremde DNA-Segmente eingefügt werden und mit den Phagen in den Bakterienzellen vermehrt werden.

Die Vorteile der Phagen bei der DNA-Klonierung liegen darin, daß sie wesentlich leichter als Plasmide in Bakterien eindringen und höhere Mengen rekombinanter DNA gewonnen werden können, die dann möglicherweise zu einer effizienteren Transfektion von Eukaryontenzellen führen. Mit solchen Viruspartikeln ist die Klonierungseffizienz noch zehn mal höher als bei der routinemäßigen Plasmid-Transformation (Stryer, 1994).

Die oben erwähnte Problematik bei der Integration rekombinanter DNA-Moleküle ins Genom der eukaryotischen Zelle und ihre Auswirkungen bleiben jedoch bestehen.

Eine andere Methode, die möglicherweise zu einer besseren Insertion von Genen ins Genom führt, besteht darin, neue Gene über Viren in eukaryotische Zellen zu bringen. Die wirksamsten Vektoren sind dabei Retroviren, die ihre Wirte normalerweise nicht töten. Mit Hilfe der Reversen-Transkriptase entsteht eine doppelhelikale DNA-Form des Virus-Genoms, die mit statistischer Wahrscheinlichkeit in die chromosomale DNA der Wirtszelle eingebaut wird und zusammen mit der normalen Zell-DNA wirkungsvoll exprimiert und repliziert wird.

Ein Beispiel aus der Medizin offenbart die Möglichkeiten der Gentherapie, aber auch welche Schwierigkeiten damit verbunden sind. Folgende Erkenntnisse über die somatische Gentherapie der Mukoviszidose konnten bisher gesammelt werden (Hildebrand, 1997):

In der somatischen Gentherapie der Mukoviszidose, der häufigsten autosomal-rezessiven Stoffwechselerkrankung, konnte *in vitro* als auch *in vivo* an Ratten über Adenoviren, die spezifisch Atemwegsepithelien infizierten, die fehlende DNA-Information, das CFTR-Gen, in Bronchialepithelien übertragen werden.

In 70% der Fälle handelt es sich bei dem Gendefekt um eine Mutation auf dem langen Arm des Chromosom 7, wo die Aminosäure Phenylalanin in Position 508 des Proteins fehlt. Das intakte Gen kodiert für ein Protein, den “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator” (CFTR), welcher die Chloridpermeabilität an der Zellmembranoberfläche herabsetzt.

In dem Artikel faßt die Autorin zusammen, daß in klinischen Studien an Mukoviszidose-Patienten sich der Erfolg des Gentransfers jedoch nicht einstellte, da man für ein effizientes Transferergebnis zu hohe Virusdosen benötigte. Entzündungsreaktionen, kanzerogenes Risiko der Adenoviren, Bildung neuer Genkombinationen aus Virus- und Wirtszellen sowie humorale Immunmechanismen zeigten die Grenzen dieser Methode am Menschen auf.

Der Nachteil der Liposomen-Technik, die auch in dieser Arbeit zur Transfektion der BeWo-Zellen Verwendung fand und in einer Studie als Vektor für die Behandlung von Mukoviszidose-Patienten benutzt wurde, lag darin, daß ein großer Teil der DNA nach der Membranfusion und Endozytose intrazellulär durch lysosomale Enzyme zerstört wurde. Liposomen haben im Gegensatz zu Viren zwar keine antigene Wirkung auf den Organismus und tragen nicht zum Risiko einer Rekombination bei, doch sie verfügen intrazellulär über keinen Mechanismus, der die transfizierte DNA, wie bei den Viren, in den Zellkern bringt. Es mußten daher große Mengen von Liposomen-DNA-Komplexen eingesetzt werden, um eine effiziente Korrektur *in vivo* zu erreichen. Außerdem wurde in einer Studie die Wirksamkeit dieses DNA-Transfers nur an der Nasenschleimhaut von Patienten nachgewiesen, am Bronchialepithel allerdings noch nicht (Hildebrand, 1997).

Ferner müßte die Behandlung mit Liposomen regelmäßig wiederholt werden, wobei die Verträglichkeit der häufigen Applikation einer hohen Menge DNA und Liposomen bisher unbekannt ist.

Diese Beispiele somatischer Gentherapie am Menschen zeigen, mit welchen Problemen und unkalkulierbaren Risiken ein Gentransfer *in vivo* verbunden ist.

Neben dem Problem der richtigen Wahl eines effizienten Vektors und der oft nur kurzen Wirkdauer des transfizierten Gens in eukaryotischen Zellen, haben die in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsexperimente an der Chorionkarzinomzelllinie BeWo gezeigt, daß ein dauerhafter Gen-Transfer von zahlreichen exogenen und endogenen Faktoren abhängig sein kann. Insbesondere der Wahl eines geeigneten Selektionsdruckes sowie der Art und Lokalisation des Einbaus von Cx-Gen und Resistenzgen in Expressionsvektoren kommt höchster Bedeutung zu.

Eine neuartige Technik, das Doppel-Ersatz-Verfahren (“Double Replacement”) bietet die Möglichkeit, DNA-Sequenzen *in-vivo* gegen andere Sequenzen auszutauschen (Wu et al., 1994). Über homologe Rekombination in embryonale Stammzellen wird eine Zielsequenz durch eine veränderte Sequenz ersetzt, ohne daß Fremdsequenzen wie Selektionsmarker zurückbleiben.

Diese Technik könnte zukünftig Methode der Wahl werden, da gezielt Genveränderungen an Zellen vorgenommen werden können, ohne daß diese von störenden Umgebungs-Sequenzen auf Vektoren, wie z. B. methylierte CpG-Sequenzen oder von der Wirksamkeit eines geeigneten Selektionsdruckes abhängig sind.

E. Ausführliche Zusammenfassung

Gap-junctions haben einen bedeutenden Einfluß auf die Organisationsstruktur eines multizellulären Organismus. Die Vermittler der direkten Zell-Zell-Kommunikation sind in der Lage, durch Expression verschiedener Connexine Zellverbände mit unterschiedlicher Funktion vom umgebenden Gewebe abzugrenzen und sog. Funktions-Kompartimente zu bilden. Sie spielen innerhalb des Gewebes eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Proliferations-, Invasions- und Differenzierungsprozessen.

Ein Verlust oder Mangel dieser interzellulären Proteinkanäle, welches sich durch zahlreiche Tumorpromotoren induzieren läßt, wird als ein wesentlicher Faktor im multikausalen Geschehen der Karzinogenese diskutiert.

Um ihren Einfluß auf Proliferation, Invasion und Differenzierung zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Chorionkarzinomzelllinie BeWo mit drei verschiedenen Connexingenen transfiziert. Ziel der Arbeit war es, durch Manipulation der Cx-Expression eine Korrelation zwischen der Ausbildung verschiedener Gap-junction-Proteine und dem Proliferations- und Invasionsvermögen dieser Chorionkarzinomzelllinie aufzuzeigen.

Die Bedeutung der Expression verschiedener Connexine für Proliferations- und Differenzierungsvorgänge wird insbesondere bei der Entwicklung der Plazenta herausgestellt. Die Bildung von Connexin-Kanälen wird für die kontrollierte Invasion des Trophoblasten in das maternale Gewebe mitverantwortlich gemacht. Transfektionsexperimente sollten darüber Aufschluß geben, ob Connexine an den molekularen Mechanismen beteiligt sind, die den benignen Trophoblasten trotz seiner proliferativen und invasiven Eigenschaften vom unkontrollierten, destruierenden und infiltrativen Wachstums seiner malignen Variante, dem Chorionkarzinom, unterscheidet.

Dazu wurden parentale BeWo-Zellen, die immunhistochemisch lediglich eine schwache und inhomogene Cx40-Expression zeigen, mit verschiedenen Connexin-Expressionsvektoren sowie einem Puromycin-Selektionsvektor co-transfiziert. Die Connexin-Expressionsvektoren trugen die cDNA-Sequenzen für Cx26, Cx40 und Cx43.

Zunächst konnte an zahlreichen mit Cx26, Cx40 und Cx43 stabil transfizierten Zellklonen immunhistochemisch eine homogene exogene Cx-Expression nachgewiesen werden. Eine Proliferationsreihe sollte Aufschluß darüber geben, ob sich nach exogener Cx-Expression ein verändertes Wachstumverhalten der Cx-Transfektanten gegenüber ihren Kontrollen *in vitro* eingestellt hat. Auswirkungen der Cx-Expression auf die Differenzierung wurde anhand der β -hCG-Hormonproduktion bestimmt. Erkenntnisse über das Invasions- und Proliferationsvermögen *in vivo* sollte das Einbringen von Cx-Transfektanten und der BeWo-Kontrolle in Nacktmäuse liefern.

Zunächst konnte für Cx26 und Cx43 eine Reduktion der Zellteilungsrate gegenüber der BeWo-Kontrolle festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ging die Expression von Cx40 mit einer erhöhten Proliferation einher. Letzteres spricht für eine zellspezifische Eigenschaft dieses Cx-Kanals, da eine Cx40-Expression nicht nur in dieser malignen humanen Trophoblastzelllinie, sondern auch in einer als extravillösen Trophoblast bezeichneten

Zellpopulation der humanen Plazenta nachweisbar war. In beiden Zellpopulationen war der Cx40-Kanal mit einer erhöhten Proliferation assoziiert.

Mit zunehmender Kulturdauer änderten sich jedoch die Wachstumsverhältnisse. Die daraufhin erfolgte immunhistochemische Untersuchung der BeWo-Transfektanten im Wiederholungsansatz zur Bestimmung der Proliferation ergab bei den meisten Cx-Transfektanten einen Verlust der jeweiligen Connexine. Dieser Cx-Verlust ging mit umgekehrten Proliferationsraten einher, was den Cx-spezifischen Einfluß auf die Proliferation der malignen Trophoblastzellen bestätigte: Immunhistochemisch-negative Cx26- und Cx43-Transfektanten zeigten eine erhöhte Zellteilungsrate, während die schwächere Expression von Cx40 mit einer reduzierten Zellteilungsrate einherging.

Die Erkenntnis eines nicht dauerhaften Gen-Transfers, welche aus den Transfektionsexperimenten dieser Arbeit zu ziehen ist, ist aus der Literatur im Rahmen anderer Transfektionsstudien bekannt. Bei der Suche nach den Ursachen des Connexinverlustes konnte durch RNA-Analysen festgestellt werden, daß die Cx-Transfektanten noch über mRNA-Transkripte verfügten, auch wenn auf Proteinebene immunhistochemisch kein Cx-Nachweis mehr festzustellen war. Die Analyse der β -hCG-Hormonproduktion zeigte in allen Versuchsansätzen hohe Werte bei den parentalen BeWo-Zellen und niedrige Werte bei den Cx-Transfektanten und Puromycin-Klonen. Diese Feststellungen führten zu dem Verdacht, daß Puromycin, welches die Proteinbiosynthese hemmt und als Selektionsmittel den Transfektanten ins Medium zugeführt wurde, toxisch auf diese einwirkt.

RNA-Analysen der Transfektanten hinsichtlich der Transkription des Puromycin-Resistenzgens ergaben, daß dieses nicht mehr in ausreichendem Maße abgelesen wird, um das zugeführte Puromycin zu inaktivieren.

Um den toxischen Einfluß von Puromycin auf die BeWo-Zellklone näher zu untersuchen, wurden Proliferation und Differenzierung bei verschiedenen Puromycin-Dosen im Medium an einigen Transfektanten exemplarisch miteinander verglichen. Dabei zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang von β -hCG-Hormonproduktion und Puromycin-Dosis. Je höher die Dosis war, desto geringer die β -hCG-Menge im Medium. Somit kann β -hCG als sensibler Marker für das Ausmaß der auf die Zellen einwirkenden Toxizität angesehen werden.

Bei der weiteren Analyse der RNA-Untersuchungen zeigte sich, daß Cx-Transfektanten, die eine höhere Transkriptionsrate für das exogene oder endogene Connexin aufwiesen mit tendenziell höheren β -hCG-Werten einhergingen und höhere Puromycin-Konzentrationen bei diesen Transfektanten nicht zu einer signifikanten Reduzierung ihrer Zellteilungsraten führten. Dies zeigt zum einen, daß eine geringe Cx-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation bei den Transfektanten weiter fortbestand und der immunhistochemische Cx-Nachweis nicht sensitiv genug ist, um den kompletten Kommunikationsstatus einer Zelle zu erfassen. Zum anderen zeigen diese Ergebnisse, daß bestehende Cx-Kanäle eine Art Detoxifizierungsfaktor darstellen können und diese Zellen im Sinne eines „Bystander-Effektes“ das auf sie einwirkende Puromycin durch den Transfer anderer protektiver Substanzen subtoxisch tolerieren oder möglicherweise auch ohne Ablesen des Puromycinresistenzgens inaktivieren. In diesem Zusammenhang ist die bei längerer Kultivierungsdauer durch Selektion entstehende

Toleranzentwicklung einiger Klone gegenüber dem Puromycin sowie die aus der Literatur bekannte Existenz von primären Multiresistenzgenen einiger Tumore zu diskutieren, die zur Abwehr gegenüber exogenen Noxen spezifische Glykoproteine sezernieren.

Die Entwicklung von Tumoren in Nacktmäusen konnte nach Einbringen verschiedener Cx-Transfektanten nicht beobachtet werden. Damit war eine Aussage zu Cx-abhängigem Invasions- und Proliferationsverhalten *in vivo* nicht möglich.

Insgesamt erwies sich die BeWo-Zelllinie für Transfektionsexperimente mit dem Ziel eines dauerhaften Gen-Transfers als instabil. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die bei der Bestimmung von Proliferation und Differenzierung transfizierter Zellen zu berücksichtigen sind.

Die Unterschiede in der Zellteilungsrate zwischen Cx-Transfektanten und parentalen BeWo-Zellen allein aufgrund der exogenen Cx-Expression zu sehen, ist nicht zulässig. Die Zellteilungsrate und andere Parameter wie Differenzierung werden zusätzlich durch den Selektionsmarker limitiert. Dies muß bei der Beurteilung von Connexin-induzierter Wachstumsinhibition bei *in vitro*-Experimenten an manchen transfizierten Zelllinien möglicherweise stärker berücksichtigt werden als bisher vermutet.

Transfektionsexperimenten mit dauerhaftem Gen-Transfer sind Grenzen gesetzt. DNA-Inaktivierung durch Methylierung, die Art der Integration transfizierter DNA ins Genom somatischer Zellen, die Wahl des Vektors und insbesondere der Selektionsdruck - wie sich in meinen Experimenten herausstellte - sind schwer beeinflussbare Faktoren, die zu einem Verlust der Expression des transfizierten Gens führen können.

Zusammenfassung:

Gap-junction-Kanäle spielen eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle von Zell-Proliferation und Zell-Differenzierung. Tumorzellen, deren Kontrolle über ein geregeltes Wachstum und Differenzierung verloren gegangen ist, zeigen häufig eine gestörte Zell-Zell-Kommunikation. Diese Eigenschaften können durch Transfektion von Connexinen, den Proteinuntereinheiten kommunizierender Zell-Zell-Kanäle, zum Teil wiederhergestellt werden.

In dieser Arbeit wurde die Chorionkarzinomzelllinie BeWo mit verschiedenen Connexinen transfiziert, um den Einfluß dieser Kanäle auf Proliferations- und Differenzierungsverhalten zu untersuchen.

BeWo-Zellen, die nur eine sehr geringe Zell-Zell-Kommunikation über Cx40 besitzen, wurden mit der cDNA von Cx26, Cx40 und Cx43 und mit einem Puromycin-Resistenzgen stabil co-transfiziert.

Die Zellteilungsrate der Klone, die mit Cx26 und Cx43 transfiziert worden waren, war signifikant reduziert, während die der Cx40-Transfektanten gegenüber den parental BeWo-Zellen erhöht war. Die Differenzierung der Zellklone, gemessen anhand der β -hCG-Hormonproduktion, war dagegen bei den parental Zellen am stärksten ausgeprägt. Unter den Cx-Transfektanten korrelierte die Höhe der β -hCG-Produktion mit dem Ausmaß der immunhistochemisch nachgewiesenen Cx-Expression. Die geringsten β -hCG-Werte zeigten diejenigen Klone, welche nur mit dem Puromycin-Resistenzgen transfiziert worden waren.

Wiederholte immunhistochemische Untersuchungen und RNA-Analysen, nach mehreren Passagen in der Zellkultur, zeigten bei einigen Klonen eine reduzierte Connexinexpression. Diese Beobachtungen korrelierten mit erhöhten Zellteilungsraten von Cx26- und Cx43-Transfektanten sowie reduzierten Wachstumsraten von Cx40-Transfektanten.

Auch die RNA-Analysen des Puromycin-Resistenzgens zeigten eine reduzierte Transkription dieses Gens auf. Dieses Ergebnis deutete auf einen Einfluß des Puromycins auf die transfizierten Zellen hin, da die β -hCG-Produktion dieser Zellen geringer war als in der nicht-transfizierten Kontrollgruppe. Einen signifikanten Einfluß auf die Zellteilungsrate der Transfektanten bestand jedoch nicht.

Schlussfolgerungen:

1. Gap-junction-Kanäle haben eine Bedeutung für die Proliferation von BeWo-Zellen. Die verschiedenen Kanäle zeigen einen charakteristischen Einfluß auf das Proliferationsverhalten. Der proliferationssteigernde Effekt von Cx40 korreliert mit den vorangegangenen Untersuchungen am benignen Trophoblasten.
2. Das transfizierte Gen wird nach einer längeren Kultivierungsdauer der Klone nicht mehr abgelesen. Ursachen dieser Geninaktivierung werden im Zusammenhang der Gentherapie in der Literatur diskutiert.
3. Die β -hCG-Produktion ist ein sensibler Marker für die Toxizität des Puromycins auf die Zellen.

G. Literatur

Behrendtsen, O., Alexander, C.M. und Werb, Z. (1992): Metallproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Dev.*, 114, 447-169.

Benett, M.V.L., Zheng, X., Sogin, M.L. (1995): The connexin family tree. In: Kanno, Y., Kataoko, Y.K., Shiba, Y., Shibata, T., Shimazu, T. (eds.): *Intercellular communication through gap junctions*. (Elsevier: Amsterdam 1995), 3-8.

Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Oronzi Scott, M., Bone, L.J., Paul, D.L., Lensch, M.W.,

Chance, P.F., Fischbeck, K.H. (1993): Connexin mutations in x-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262, 2039-2042.

Britz-Cunningham, S.H., Shah, M.M. Zuppan, C.W., Fletcher, W.H. (1995): Mutations of the connexin 43 gap junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *New Engl. J. Med.* 332, 1323-1329.

Bruzzone, R., Haefliger, J.A., Gimlich, R.L., Paul, D.L. (1993): Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol. Biol. Cell* 4, 7-20.

Bryans, M., Kass, S., Seivwright, C., Adams, R.L.P. (1992): Vector methylation inhibits transcription from the SV40 early promotor. *FEBS Lett* 1992 Aug 31; 309(1), 97-102.

Burt, J.M., Spray, D.C. (1988): Single-channel events and gating behavior of the cardiac gap junction channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3431-3434.

Chanson, M., Meda, P. (1993): Rat pancreatic acinar cell coupling: comparison of extent and modulation in vitro and in vivo. In: Hall, J.E., Zampighi, G.A., Davies, R.M. (eds.): *Gap Junctions*, (Elsevier: Amsterdam 1993), 199-205.

Chen, S.C., Pelletier, D.B., Ao, P., Boynton, A.L. (1995): Connexin43 reverses the phenotype of transformed cells and alters their expression of cyclin/cyclin-dependent kinases. *Cell Growth Differ.* 6, 681-690.

Christ, G.J., Spray, D.C., El-Sabban, M., Moore, L.K., Brink, P.R. (1996): Gap junctions in vascular tissues. *Circ. Res.* 79, 632-646.

Comb, M., Goodman, H.W. (1990): CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucl. Acids Res.* 18, 3975-3982.

Copp, A.J. (1995): Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trend Gene.* 11, 87-93.

Dahl, E., Winterhager, E., Reuß, B., Traub, O., Butterweck, A., Willecke, K. (1996): Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo. *J. Cell Sci.* 109, 191-197.

Damsky, C.H., Fitzgerald, M.L., Fisher, S.J. (1992): Distribution patterns of the extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J. Clin. Invest.* 89, 210-222.

- Damsky, C.H., Sutherland, A., Fisher, S.J. (1993):** Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation and placentation. *FASEB J.* 7, 1320-1329.
- Delmar, M., Michaels, D.C., Johnson, T., Jalife, J. (1987):** Effects of increasing intercellular resistance on transverse and longitudinal propagation in sheep epicardial muscle. *Circ. Res.* 60, 780-785.
- Demietzel, R., Spray, D.C. (1993):** Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci.* 16, 186-192.
- Dermietzel, R., Hwang, T.K., Spray, D.S. (1990):** The gap junction family: structure, function and chemistry. *Anat. Embryol.* 182, 517-528.
- Dhein, S. (1998):** Cardiac gap junctions. (Karger: Basel 1998).
- Dhein, S. (1998):** Gap-Junction-Kanäle und zelluläre Kommunikation - Neue Erkenntnisse zur Bedeutung in der Medizin). *Dtsch. Med. Wschr.* 123, 912-917.
- Eghbali, B., Kessler, J.A., Reid, L.M., Roy, C., Spray, D.C. (1991):** Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin32 cDNA retards growth *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10701-10705.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hülser, D.F., Willecke, K. (1995):** Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129, 805-817.
- El-Sabban, M.E., Pauli, B.U. (1991):** Cytoplasmic dye transfer between metastatic tumor cells and vascular endothelium. *J. Cell Biol.* 115 (5), 1375-1382.
Env. Health Persp. 93, 191-197.
- Faber, D.S., Yang, X.D., Wolszon, L.R. (1993):** Plasticity of gap junctions at mixed synapses. *In*: Hall, J.E., Zampighi, G.A., Davies R.M. (eds.): *Gap Junctions* (Elsevier: Amsterdam 1993), 135-139.
- Fick, J., Barker, F.G., Dazin, P., Westphale, E.M., Beyer, E.C. (1995):** The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity *in vitro*.
- Fisher, R., Levine, M., Buchwald, N., Micevych P., Zampighi, G. (1990):** Regulation of gap junction proteins in neostriatum. *Soc. Neurosci. Abst.* 16, 1230.
- Fisher, R.S., Micevych P.E. (1993):** Regulation of connexin32 in motor networks of mammalian neurons. *In*: Hall, J. E., Zampighi, G.A., Davis R.M. (eds.): *Gap Junctions*. (Elsevier: Amsterdam 1993), 141-148.
- Friedmann, S.J., Galuszka, D., Gedeon, I., Dewar, C.L., Skehan, P., Heckmann, C.A. (1984):** Changes in cell-substratum adhesion and nuclear-cytoskeletal anchorage during cytodifferentiation of BeWo Choriocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 154, 386-393.
- Gabriel H.-D., Jung, D., Butzler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E., Willecke, K. (1998):** Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.* 140(6), 1453-61.
- Gong X.H., Li, E., Klier, G., Kumar, N., Gilula, N.B. (1996):** Disruption of $\alpha 3$ connexin gene leads to age-related cataract formation in mice. *Mol. Biol. Cell Supplement* 7, Abstract Nr. 2961.

Goodenough, D.A., Paul D.L., Jesaitis, L. (1980): Lens metabolic cooperation: a study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy. *J. Cell Biol.* 86, 576-589.

Graessmann, M., Graessmann, A. (1993): DNA methylation, chromatin structure and the regulation of gene expression. *In: DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*, J.P. Jost and H.P. Saluz, eds. (Basel-Boston-Berlin: Birkhäuser Publ.) pp. 404-424.

Grossmann, H.B., Liebert, M., Lee, I.W., Lee, S.W. (1994): Decreased connexin and intercellular communication in human bladder cancer cells. *Cancer Res.* 54, 3062-3065.

Grümmer, R., Hohn, H.P., Mareel, M.M., Deker, H.W. (1994): Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system. *Placenta* 15, 411-429.

Guthrie, S.C., Gilula, N.B. (1989): Gap-junctional communication and development. *Trends Neurosci.* 12, 12-16.

Haefliger, J.-A., Bruzzone, R., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Paul, D.L. (1992): Four new members of the connexin family of gap junction proteins - molecular cloning, expression and chromosome mapping. *J. Biol. Chem.* 267, 2057-2065.

Hamel, W., Magnelli, L., Vincenzo, P., Israel, M.A. (1996): Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Research* 56, 2697-2702.

Heilige, C., Zellnig, G., Hofmann-Wellenhof, R., Fink-Puches, R., Smolle, J., Tritthart, H.A. (1997): Interrelation of motility, cytoskeletal organization and gap-junctional communication with invasiveness of melanocytes cells in vitro. *Invasion Metastasis* 17, 26-41.

Hellmann, P. (1995): Untersuchungen zur endogenen und exogenen Connexinexpression in verschiedenen humanen Chorionkarzinomzelllinien und deren physiologische Charakterisierung. Dissertation, Universität Essen.

Hellmann, P., Grümmer, R., Schirmacher, K., Rook, M., Traub, O., Winterhager, E. (1998): Different connexin genes transfected into human choriocarcinoma cell line alter their physiological phenotype. *J. of Exp. Cell Res.*, in press.

Hellmann, P., Winterhager, E., Spray, D.C. (1996): Properties of connexin40 gap-junction channels endogenously expressed and exogenously overexpressed in human choriocarcinoma cell lines. *Pflugers Arch* 432(3), 501-9.

Hildebrand, V. (1997): Gentherapie bei Mukoviszidose - Die Suche nach dem Genvektor. *Via medici*, 4-1997 Georg Thieme Verlag; Stuttgart; Oktober, 1997; s. bes S. 32-34

Holtz-Wagenblatt, A., Shalloway, D. (1993): Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit. Rev. Oncogen* 4, 541-558.

Hossain, M.Z., Zhang, L.X., Bertram, J.S. (1993): Retinoids and carotenoids upregulate gap-junctional communication. *In: Hall, J.E., Zampighi, G.A., Davis, R.M. (eds.): Gap Junctions.* (Elsevier: Amsterdam 1993), 301-309.

- Ionasescu, V., Serby, C., Ionasescu, R. (1994):** Point mutations of the connexin32 (GJB1) gene in X-linked dominant Carcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum. Mol. Gent.* 3, 355-358.
J Biol Chem 262, 10903-10906.
J Cell Biol 113, 437-449.
J Clin Endocrin 32, 683-687.
J.N.C.I 81, 768-775.
- Jara, P.I., Boric, M.P., Saez, J.C. (1995):** Leukocytes express connexin 43 after activation with lipopolysaccharide and appear to form gap junctions with endothelial cells after ischemia-reperfusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7011-7015.
- Klaunig, J.E., Ruch, R.J. (1990):** Biology of disease. *Lab. Invest.* 62, 136-142.
- Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E., Sauger, J.M., Strauss, J.F. III (1986):** Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinol.* 118, 1567-1582.
- Knoth, M., Pattillo, R.A., Garancis, J.C., Gey, G.O., Ruckert, A.C.F., Mattingly, R.F. (1969):** Ultrastructure and hormone synthesis of choriocarcinoma *in vitro*. *Choriocarcinoma* 54, 479-488.
- Kohler, P.O., Bridson, E. (1971):** Isolation of hormone-producing clonal lines of human chorioncarcinoma.
- Kohler, P.O., Bridson, E. (1971):** Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocacinoma. *J.Clin Endocrin-* 32, 683-687.
- Krutovskikh, V., Mazzoleni, G., Mironov, N., Omori, Y., Aguelon, A.-M., Mesnil, M., Berger, F., Partensky, C., Yamasaki, H. (1994):** Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin32. *Int. J. Cancer* 56, 87-94.
- Kumar, N.M., Gilula, N.B. (1996):** The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.
- Kurman, R.J., Main, C.S., Chen, H.C. (1984):** Intermediate trophoblast: a distinct form of trophoblast with specific morphological, biochemical and functional features. *Placenta* 5, 349-370.
- Kwak, B.R., Jongsma, H.J. (1996):** Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol. Cell. Biochem.* 157, 93-99.
- Laird, D.W. (1996):** The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 311-318.
- Landers, J.E., Haines, D.S., Strauss, J.F. III, George, D.L. (1994):** Enhanced translation: A novel mechanism of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumor cells. *Oncogene* 9, 2745-2750.
- Lee, S.W., Tomasetto, C., Paul D., Keyomarsi, K., Sager, R. (1992):** Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J. Cell Biol.* 118, 1213-1221.
- Librach, C.L., Werb, Z., Fitzgerald, M.L., Chiu, K., Corwin, N.M., Esteves, R.A., Grobelny, D., Galaray R., Damsky C.H., Fisher S.J. (1991):** 92-kD type collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts.
- Loewenstein, W. (1988):** The cell-to-cell channels of gap junctions. *Cell* 48, 725-726.

- Loewenstein, W.R. (1979):** Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem. Biophys. Acta* 56, 1-65.
- Loewenstein, W.R. (1979):** Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 61, 829-913.
- Loewenstein, W.R., Kanno, Y. (1966):** Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. *J. Cell Biol.* 33, 225-234.
- Loke, Y.W. (1983):** Human trophoblast in culture. In: *Biology of trophoblast*, Y.W. Loke, A. Whyte (eds), Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam, pp. 663-701.
- Makowski, L., Caspar, D.I.D., Goodenough, D.A. (1977):** Gap-junction structure. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J. Cell Biol.*, 74, 629-645.
- Marzusch, K., Ruck, P., Horny, H.P., Dietl, J., Kaiserling, E. (1995):** Expression of the p53 tumor suppressor gene in human placenta: an immunohistochemical study. *Plazenta* 16, 101-104. *Med. Sciences* 92, 11071-11075.
- Meehan, R.R., Lewis, J.D., Bird, A.P. (1992):** Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein that binds methylated DNA. *Nucl. Acid Res.* 19, 5085-5092.
- Mehta, P. P., Holtz-Wagenblatt, A., Rose, B., Shalloway, D., Loewenstein, W.R. (1991):** Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J. Membr. Biol.* 124, 207-225.
- Mesnil, M., Colette, P., Gérard, T., Willecke, K., Yamasaki, H. (1996):** Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Med. Science* 93, 1831-1835.
- Mesnil, M., Krutovskikh, V., Piccoli, C., Traub, O., Willecke, K., Yamasaki, H. (1995):** Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res.* 55, 629-639.
- Mesnil, M.C., Piccoli, C., Klein, J.L., Morand, I., Yamasaki, H. (1993):** Lack of correlation between the gap junctional communication capacity of human colon cancer cell lines and expression of the DCC gene, a homologue of a cell adhesion molecule (N-CAM). *Jpn. J. Cancer Res.* 84, 742-747.
- Midgley, A.R., Pierce, G.B. (1962):** Immunohistochemical localization of human chorionic gonadotropin. *J. Exper. Med.* 115, 289-297.
- Mühlhauser, J., Crescimanno, C., Kaufmann, P., Hofler, H., Zaccheo, D., Castelluci, M. (1993):** Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R.
- Müller, A., Gottwald, M., Tudyka, T., Linke, W., Klaus, W., Dhein, S. (1997):** Increase in gap junction conductance by an antiarrhythmic peptide. *Europ. J. Pharmacol.* 327, 65-72.
- Musil, L.S., Goodenough, D.A. (1995):** Biochemical analysis of connexon assembly. In: Kanno, Y., Kataoko, Y.K., Shiba, Y., Shibata, T., Shimazu, T. (eds.): *Intercellular communication through gap junctions*. Progress in Cell Research. (Elsevier: Amsterdam 1995), 327-330.
- Naus, C.C.G., Elisevitch, K., Zhu, D., Belliveau, D. J., Del Maestro, R.F. (1992):** *In vivo* growth of C6 glioma cells transfected with connexin 43 cDNA. *Cancer Res.* 52, 4208-4213.

- Nelles, E., Bützler, C., Jung, D., Temme, A., Gabriel, H.D., Dahl, E., Traub, O., Stümpel, F., Jungermann, K., Zielasek, J., Toyka, K.V., Dermietzel, R., Willecke, K. (1996): Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9565-9570.
- Ohlsson, R. (1989): Growth factors, protooncogenes and human placental development. *Cell Diff. Dev.* 28, 1-7.
- Omori Y., Dufлот-Dancer, A., Mesnil, M., Yamasaki, H. (1996): Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control: approach with site-directed mutagenesis and dominant-negative effects. *Toxicol Lett* 96.97, 105-10.
- Oyamada, M., Sakamoto, H., Enomoto, K., Oyamada, Y., Kojima, N., Sawada, N., Mori, M. (1995): Expression of multiple connexins is differentially modulated during multistage hepatocarcinogenesis. In: Kanno, Y., Kataoko, Y.K., Shiba, Y., Shibata, T., Shimazu, T. (eds.): *Intercellular communication through gap junctions*. (Elsevier: Amsterdam 1995), 103-106.
- Patillo, R.A., Gey, G.O., Delfs, E., Mattingly, R.F. (1968): Human hormone production in vitro. *Science* 159, 1467-1469.
- Patillo, R.A., Husa, R., Bernstein, R., Delfs, E. (1971): The Jar cell line - continuous human multihormone production and controls. *In vitro* 6, 398 Abstr. 101.
- Patillo, R.A., Husa, R.O., Delfs, E., Mattingly, R.F. (1970): Control mechanisms for gonadotrophic hormone production *in vitro*. *Science* 159, 1467-1468.
- Paul, D.L. (1995): New functions for gap junction connexon. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 665-672.
- Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W.B., Brosens, I. (1980): Trophoblast invasion of human Decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1, 3-19.
- Quenan, J.T., Kao, L.C., Arboleda, C.E., Ulloa-Aguirre, A., Golos, T.G., Cines, D.B., Strauss, J.F. (1987): Regulation of urokinase-type plasminogen activator production by cultured human cytotrophoblast.
- Razin, A., Cedar, H. (1991): DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Reviews* 55, 451-458.
- Reaume, A., deSousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, L.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., Rossant, J. (1995): Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin 43. *Science* 267, 1831-1834.
- Reuss, B., Hellmann, P., Traub, O., Butterweck, A., Winterhager, E. (1997): Expression of Connexin31 and Connexin43 Genes in Early Rat Embryos. *Dev. Genet.* 21, 82-90.
- Rose, B., Mehta, P.P., Loewenstein, W.R. (1993): Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity. *Carcinogenesis (Lond.)* 14, 1073-1075.
- Schmidt-Kastner, P.K., Jardine, K., Cormier, M., Mc Burney, M.W. (1996): Genes transfected into embryonal carcinoma stem cells are both lost and inactivated at high frequency. *Somat Cell Mol Genet* 22(5), 383-292.
- Schmidt-Matthiesen, H.; Bastert, G. (1982): *Gynäkologische Onkologie*. Stuttgart-New Vork: Schattauer; s. bes. S. 99ff.

Schwartzmann, G.O.H., Wiegandt, H., Rose, B., Zimmermann, A., Ben-Haim, D., Loewenstein, W.R. (1981): The diameter of the cell-to-cell junctional membrane channels, as probed with neutral molecules. *Science* 213, 551-553.

Simon, A.M., Goodenough, D.A., Li, E., Paul, D.L. (1997): Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385, 525-529.

Simon, A.M., Goodenough, D.A., Paul, D.L. (1998): Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol.* 8(5), 295-298.

Singh, M.V., Bhatnagar, R., Price, C.J., Malhotra, S.K. (1997): Gap-junctions in 9L and C6 glioma cells. *Cytobios.* 89, 209-225.

Spray, D.C., Burt, J.M. (1990): Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am. J. Physiol.* 258, C195-C205.

Stauffer, K.A. (1995): The gap junction proteins $\beta 1$ -connexin (connexin-32) and $\beta 2$ -connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J. Biol. Chem.* 270, 6768-6772.

Stegner, H.E. (1996): Gynäkologie und Geburtshilfe; 6. Aufl.; Stuttgart: Enke; s. bes. S. 92ff.

Stoker, M.G.P. (1967): Transfer of growth inhibition between normal and virus-transformed cells: autoradiographic studies using marked cells. *J. Cell Sci.* 2, 293-304.

Strickland, S., Reich, E., Sherman, M.L. (1976): Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* 9, 231-240.

Strickland, S., Richards, W.G. (1992): Invasion of the trophoblast. *Cell* 71, 355-357.

Stryer, L. (1994): Biochemie; 2. Aufl.; Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akad. Verlag, 1994, s. bes. S. 121-142.

Takamizawa, H., Sekiya, S. (1984): Cell biology of choriocarcinoma. *Asia-Oceania J. Obst. Gynecol.* 10, 245-256.

Temme, O., Buchmann, A., Gabriel, H.D., Nelles, E., Schwarz, M., Willecke, K. (1997): High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in connexin32 deficient mice. *J. Clin. Res. Clin. Oncol.* 123 (Suppl. 1), 5.

Torhorst, J. (1995): Plazenta. In: Riede, U.-N., Schaefer, H.-E. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Aufl.; S. 893-896. Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag.

Traub, O., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Elfgang, C., Bastide, B., Scheidtmann, K.H., Hülser, D.F., Willecke, K. (1994): Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur. J. Cell Biol.* 64, 101-112.

Von Ostau, C. (1997): Zeitliches und räumliches Expressionsmuster von Gap-junction Connexinen während der Entwicklung der humanen Plazenta und im männlichen Chorionkarzinom. Dissertation, Universität Essen.

- Vrionis, F.D., Wu, J.K., Qi, P., Waltzmann, M., Cherington, V., Spray, D.C. (1997):** The bystander effect exerted by tumor cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV tk) gene is dependent on connexin expression and cell communication via gap junctions. *Gene Ther.* 4(6), 577-585.
- Waltzmann, M.N., Spray, D.C. (1995):** Exogenous expression of connexins for physiological characterization of channel properties: Comparison of methods and results. *In:* Kanno, Y., Kataoko, Y.K., Shiba, Y., Shibata, T., Shimazu, T. (eds.): *Progress in cell research 4: Intercellular communication through gap junctions.* (Elsevier: Amsterdam 1995).
- Wilgenbus, K.K., Kirkpatrick, C.J., Knuechel, R., Willecke, K. und Traub, O. (1992):** Expression of cx26, cx32 and cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer* 51, 522-529.
- Wilgenbus, K.K., Kirkpatrick, C.J., Knuechel, R., Willecke, K., Traub, O. (1992):** Expression of connexin32 and connexin43 Gap-junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int. J. Cancer* 51, 522-529.
- Winterhager, E., Grümmner, R., Jahn, E., Willecke, K., Traub, O. (1993):** Spatial and temporal expression of cx26 and cx43 in rat endometrium during trophoblast invasion. *Development Biol.* 157, 399-409.
- Winterhager, E., Reuss, B., Hellmann, P., Spray, D.C., Gruemmer, R. (1996):** Gap junction and tissue invasion: a comparison of tumorigenesis and pregnancy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23(12), 1058-61.
- Winterhager, E., Von Ostau, C., Gerke, M., Gruemmer, R., Traub, O., Kaufmann, P. (1999):** Connexin Expression Patterns in Human Trophoblast Cells during Placental Development. *Placenta* 20(8), 627-638.
- Yagel, S., Khokha, R., Denhardt, D.T., Kerbel, R.S., Parhar, R.S., Lala, P.K. (1989):** Mechanisms of cellular invasiveness: a comparison of amnion invasion *in vitro* and metastatic behaviour *in vitro*.
- Yamasaki, H., Mesnil, M., Omori, Y., Mironov, N., Krutovskikh, V. (1995):** Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 333(1-2), 181-8.
- Yamasaki, H., Omori, Y., Zaidan-Dagli, M.L., Mironov, N., Mesnil, M., Krutovskikh, V. (1999):** Genetic and epigenetic changes during multistage carcinogenesis. *Cancer Detect Prev.* 23 (4), 273-279.
- Yamasaki, H. (1991):** Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis.

Lebenslauf

Name: Martin Gerke
Geburtsdatum/-ort: 7. Juli 1972 in Kevelaer

Schulischer Werdegang:

1979 - 1983 St.-Hubertus-Grundschule in Kevelaer
1983 - 1992 Kardinal-von-Galen-Gymnasium in Kevelaer
Juni 1992 Abitur

Juni 1992 – September 1993 Zivildienst im Marienhospital Kevelaer

Studium:

Oktober 1993 – Juli 1999 Studium der Humanmedizin an der Universität Gesamthochschule Essen
Oktober 1999 – September 2000 Praktisches Jahr am Lutherkrankenhaus Essen-Steele und Derriford Hospital Plymouth
November 2000 Abschluß der Ärztlichen Prüfung
Seit Januar 2001 Arzt im Praktikum in der Internistischen und Onkologischen Abteilung der Essen-Kliniken-Mitte, Huyssenstiftung

Dissertation:

März 1996 – Februar 2000 Anfertigung der Dissertation an der Universität GH-Essen, Institut für Anatomie, Prof. Dr. rer. nat. E. Winterhager
Oktober 1996 – März 1997 Forschungssemester und wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen
August 1997 – September 1997 Forschungsaufenthalt im Department of Stomatology an der University of California San Francisco
September 2000 Postervorstellung bei der 17. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg

Danksagung

Frau Prof. Dr. E. Winterhager danke ich für die interessante Themenstellung sowie die freundliche Betreuung meiner Arbeit. Dank Ihrer Unterstützung und Hilfestellung gewann ich Interesse an Wissenschaft und Forschung und entwickelte die Fähigkeit zu selbständigem wissenschaftlichen Arbeiten sowie die Gabe einer hohen Frustrationstoleranz („So ist halt Forschung!“). Ihr verdanke ich einen aufregenden Forschungsaufenthalt an der University of California San Francisco, wo ich im „Fisher-Lab“ Untersuchungen zur Connexin-Expression am humanen Trophoblasten durchführen durfte.

Peter Hellmann gilt mein Dank für die Einführung in die Transfektion, sowie die anfängliche Betreuung meiner Arbeit; Barbara Stroebel danke ich für Ihre freundliche Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten.

Ruth Grümmer danke ich für die vielen wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen sowie für die Betreuung der Nacktmausversuche.

Ein besonderer Dank gilt Gabi Luhn und Georgia Rauter, die mir bei der Durchführung der „Northern Blot“-Analyse und Immunhistochemie mit Rat und Tat zur Seite standen.

Oliver Burlon danke ich herzlich für die Übernahme gelegentlicher Fütterungszeiten meiner Klone sowie die zahlreichen anregenden Diskussionen rund um die Forschung.

Heinz Dieter Gabriel sei Dank für seine stete Diskussionsbereitschaft sowie der kritischen Durchsicht wesentlicher Teile meiner Arbeit. Für konstruktives Korrekturlesen meiner Arbeit bedanke ich mich ferner bei Simone Scotti, Oliver Burlon und Theodor Verhülsdonk.

Dem Hormonlabor der Gynäkologischen Abteilung gilt mein Dank für die stets freundliche Bereitschaft zur Untersuchung meiner Kulturmedien auf β -hCG - trotz der hoch frequentierten Besuche.

Für die Photoarbeiten und Hilfe bei der optischen Gestaltung dieser Arbeit am Computer bedanke ich mich bei Dave Kittel, v. a. für seine Geduld bei stundenlangen Sitzungen im Kampf gegen das Microsoft-Office-Paket.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Gisela Huch und Barbara Stroebel für die Mithilfe bei den Entsorgungsarbeiten eines überschwemmten Labors an einem Freitagabend sowie bei allen anderen Arbeitskolleginnen und -kollegen für das gute Arbeitsklima.

Abstract

Gap-junction-Kanäle spielen eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle von Zell-Proliferation und Zell-Differenzierung. Tumorzellen, deren Kontrolle über ein geregeltes Wachstum und Differenzierung verloren gegangen ist, zeigen häufig eine gestörte Zell-Zell-Kommunikation. Diese Eigenschaften können durch Transfektion von Connexinen, den Proteinuntereinheiten kommunizierender Zell-Zell-Kanäle, zum Teil wiederhergestellt werden.

In dieser Arbeit wurde die Chorionkarzinomzelllinie BeWo mit verschiedenen Connexingenen transfiziert, um den Einfluß dieser Kanäle auf Proliferations- und Differenzierungsverhalten zu untersuchen.

BeWo-Zellen, die nur eine sehr geringe Zell-Zell-Kommunikation über Cx40 besitzen, wurden mit der cDNA von Cx26, Cx40 und Cx43 und mit einem Puromycin-Resistenzgen stabil co-transfiziert.

Die Zellteilungsrate der Klone, die mit Cx26 und Cx43 transfiziert worden waren, war signifikant reduziert, während die der Cx40-Transfektanten gegenüber den parental BeWo-Zellen erhöht war. Die Differenzierung der Zellklone, gemessen anhand der β -hCG-Hormonproduktion, war dagegen bei den parental Zellen am stärksten ausgeprägt. Unter den Cx-Transfektanten korrelierte die Höhe der β -hCG-Produktion mit dem Ausmaß der immunhistochemisch nachgewiesenen Cx-Expression. Die geringsten β -hCG-Werte zeigten diejenigen Klone, welche nur mit dem Puromycin-Resistenzgen transfiziert worden waren.

Wiederholte immunhistochemische Untersuchungen und RNA-Analysen, nach mehreren Passagen in der Zellkultur, zeigten bei einigen Klonen eine reduzierte Connexinexpression. Diese Beobachtungen korrelierten mit erhöhten Zellteilungsraten von Cx26- und Cx43-Transfektanten sowie reduzierten Wachstumsraten von Cx40-Transfektanten.

Auch die RNA-Analysen des Puromycin-Resistenzgens zeigten eine reduzierte Transkription dieses Gens auf. Dieses Ergebnis deutete auf einen Einfluß des Puromycins auf die transfizierten Zellen hin, da die β -hCG-Produktion dieser Zellen geringer war als in der nicht-transfizierten Kontrollgruppe. Einen signifikanten Einfluß auf die Zellteilungsrate der Transfektanten bestand jedoch nicht.

Schlussfolgerungen:

1. Gap-junction-Kanäle haben eine Bedeutung für die Proliferation von BeWo-Zellen. Die verschiedenen Kanäle zeigen einen charakteristischen Einfluß auf das Proliferationsverhalten. Der proliferationssteigernde Effekt von Cx40 korreliert mit den vorangegangenen Untersuchungen am benignen Trophoblasten.
2. Das transfizierte Gen wird nach einer längeren Kultivierungsdauer der Klone nicht mehr abgelesen. Ursachen dieser Geninaktivierung werden im Zusammenhang der Genterapie in der Literatur diskutiert.
3. Die β -hCG-Produktion ist ein sensibler Marker für die Toxizität des Puromycins auf die Zellen.